

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Χαρακτηρισμός των μορίων που αλληλεπιδρούν  
με το μιτοχονδριακό υποδοχέα  
γλυκοκορτικοειδών**

Characterization of the mitochondrial  
glucocorticoid receptor interacting proteins

**Επιμέλεια εργασίας: Μηλιώτου Αντρούλλα**  
**Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Ψαρρά Άννα-Μαρία**

**ΛΑΡΙΣΑ 2012**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (TBB), στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Υπεύθυνη Καθηγήτρια:

**Ψαρρά Άννα-Μαρία**, Λέκτορας Βιοχημείας TBB, Π.Θ.

Τριμελής Επιτροπή:

**Ψαρρά Άννα-Μαρία**, Λέκτορας Βιοχημείας, TBB, Π.Θ.

**Λεωνίδας Δημήτριος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, TBB, Π.Θ.

**Μαμούρης Ζήσης**, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, TBB, Π.Θ.

Ευχαριστίες:

Πρώτα από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια, Άννα-Μαρία Ψαρρά, Λέκτορα Βιοχημείας TBB, για τη διαρκή, επιστημονική, πνευματική και ηθική υποστήριξη που μου παρείχε, καθώς και την πολύπλευρη μέριμνα και την πολύτιμη καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής διατριβής.

Περαιτέρω θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Δημήτριο Λεωνίδα και τον κύριο Ζήση Μαμούρη για τη συμμετοχή τους στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή της διπλωματικής μου εργασίας. Επιπρόσθετα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Λεωνίδα που μου επέτρεψε την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω επίσης στη συμφοιτήριά μου, Ζωή Κλήμου για την αρμονική συνεργασία και τη συνεισφορά της στη διεκπεραίωση του πρακτικού μέρους της διπλωματικής εργασίας, καθώς επίσης και στον υποψήφιο διδάκτωρ Βύρων Γοργογιέτα και την προπτυχιακή φοιτήτρια Μαρία Χαραλάμπους για την πολύτιμη βοήθειά τους.

Τέλος, θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου για την απεριόριστη αγάπη της, τη συνεχή ενθάρρυνση και κατανόηση που έδειξε καθ' όλη την πορεία των σπουδών μου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>Περίληψη .....</b>	<b>5</b>
<b>1. Εισαγωγή .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ .....</b>	<b>8</b>
1.1.1 Γενικά.....	8
1.1.2 Ρύθμιση μεταγραφής.....	8
1.1.3 Στεροειδείς ορμόνες .....	8
1.1.4 Γλυκοκορτικοειδή ως μόρια .....	9
1.1.5 Δράση στεροειδών ορμονών.....	10
1.1.6 Δομή πυρηνικών υποδοχέων .....	11
1.1.7 Δομή υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών .....	11
1.1.8 Τεταρτοταγής δομή υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.....	15
1.1.9 Μετασχηματισμός υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών .....	16
1.1.10 Μετατόπιση υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στον πυρήνα.....	17
1.1.11 Σύνδεση υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στο DNA.....	17
1.1.12 Μηχανισμοί μεταγραφικής ρύθμισης από υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.....	19
1.1.13 Θετική ρύθμιση της μεταγραφής .....	21
1.1.14 Αρνητική ρύθμιση της μεταγραφής.....	22
<b>1.2 ΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ ΩΣ ΠΡΩΤΟΓΕΝΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗ ΔΡΑΣΗΣ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ .....</b>	<b>24</b>
1.2.1 Γενικά για το μιτοχόνδριο: Δομή και λειτουργία .....	24
1.2.2 Κατανομή και αριθμός μιτοχονδρίων .....	26
1.2.3 Μιτοχονδριακό γονιδίωμα .....	27
1.2.4 Μεταγραφή μιτοχονδριακού γονιδιώματος .....	30
1.2.5 Ρύθμιση μεταγραφής μιτοχονδριακού γονιδιώματος .....	31
<b>1.3 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΙ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ .....</b>	<b>32</b>
1.3.1 Γενικά.....	32
1.3.2 TFAM .....	34
1.3.3 TFB1M, TFB2M .....	36
1.3.4 MTERF .....	36

<b>1.4</b>	<b>ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ .....</b>	<b>39</b>
1.4.1	Επίδραση στεροειδών ορμονών στη μιτοχονδριακή δομή και λειτουργία .....	39
1.4.2	Ο εντοπισμός του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στα μιτοχόνδρια .....	40
1.4.3	Η επίδραση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στη μιτοχονδριακή μεταγραφή και βιοσύνθεση των OXPHOS .....	40
1.4.4	Ο ρόλος του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στην απόπτωση .....	44
1.4.5	Η αλληλεπίδραση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 .....	45
1.4.6	Η αλληλεπίδραση της Trx-2 με τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.....	46
1.4.7	Η αλληλεπίδραση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με την PDH .....	47
<b>2.</b>	<b>Σκοπός .....</b>	<b>52</b>
<b>3.</b>	<b>Υλικά και Μέθοδοι .....</b>	<b>54</b>
<b>3.1</b>	<b>Υλικά.....</b>	<b>54</b>
3.1.1	Διαλύματα .....	54
3.1.2	Χημικά .....	56
3.1.3	Αντισώματα .....	57
3.1.4	Όργανα .....	60
<b>3.2</b>	<b>Μέθοδοι.....</b>	<b>61</b>
3.2.1	Κυτταροκαλλιέργειες .....	61
3.2.2	Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE).....	64
3.2.3	Ανοσοαποτύπωση Western (Western Blot).....	69
3.2.4	Ανοσοκατακρήμνιση [Immunoprecipitation (IP)] σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων HepG2 με χρήση protein-A beads .....	72
<b>4.</b>	<b>Αποτελέσματα .....</b>	<b>75</b>
<b>5.</b>	<b>Συζήτηση.....</b>	<b>82</b>
<b>6.</b>	<b>Βιβλιογραφία .....</b>	<b>86</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι στεροειδείς ορμόνες ρυθμίζουν ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών διαδικασιών, όπως το μεταβολισμό, τη διαφοροποίηση και την ανάπτυξη, ελέγχοντας τη μεταγραφή ειδικών γονιδίων στα κύτταρα στόχους. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, ο έλεγχος αυτός απαιτεί τη συμμετοχή διαφορετικών μεταγραφικών παραγόντων. Τα γλυκοκορτικοειδή επιτυγχάνουν την ειδική τους δράση συνδεόμενα με τους αντίστοιχους υποδοχείς τους (GR), που ανήκουν σε μια οικογένεια κυτταρικών μεταγραφικών παραγόντων και βρίσκονται σε μικρή ποσότητα μέσα στο κύτταρο.

Πολυάριθμες μελέτες έχουν επιβεβαιώσει το μηχανισμό δράσης των γλυκοκορτικοειδών μέσω της γονιδιακής ρύθμισης. Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό, η σύνδεση της ορμόνης μετατρέπει τον υποδοχέα σε ενεργό μεταγραφικό ρυθμιστή, ο οποίος εισέρχεται στον πυρήνα, όπου αναγνωρίζει ειδικές DNA αλληλουχίες, που ονομάζονται ορμονο-ανταποκρινόμενα ρυθμιστικά στοιχεία (GREs) και είναι ορμονο-επαγόμενοι ενισχυτές της μεταγραφής. Η παρουσία στο κύτταρο του ειδικού υποδοχέα και του αντίστοιχου GRE στο γονιδίωμα, καθιστά το κύτταρο ως κύτταρο στόχο για τα γλυκοκορτικοειδή και το γονιδίωμα ως δυναμικά ορμονορυθμιζόμενο.

Τα γλυκοκορτικοειδή εμφανίζουν έντονη επίδραση στη βιογένεση και τις φυσιολογικές λειτουργίες των μιτοχονδρίων και συγκεκριμένα έχουν μεγάλη σημασία για τον κυτταρικό μεταβολισμό. Τα μιτοχόνδρια είναι οργανίδια ζωτικής σημασίας, που συμμετέχουν σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες. Παρέχουν περισσότερο από το 90% των ενεργειακών αναγκών του κυττάρου μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS). Τα μιτοχόνδρια ενέχονται σε πολλά βήματα του ενδιάμεσου μεταβολισμού, στην παραγωγή ουρίας, στη βιοσύνθεση της αίμης και στη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων. Επιπλέον, τα μιτοχόνδρια αποτελούν βασικά συστατικά της απόκρισης στο stress, διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στο οξειδωτικό στρες μέσω της παραγωγής δραστικών (ή ενεργών) μορφών οξυγόνου (ROS), στην ανοσοαπόκριση, στην κυτταρική διαφοροποίηση και στην απόπτωση.

Μέχρι πρόσφατα επικρατούσε η άποψη ότι, οι επιδράσεις των στεροειδών ορμονών στα μιτοχόνδρια είναι δευτερογενείς, και οφείλονται σε πρωτογενή δράση στην έκφραση των πυρηνικών OXPHOS γονιδίων, όπως επίσης και μιτοχονδριακών μεταγραφικών παραγόντων, που μετά την είσοδό τους στα μιτοχόνδρια ελέγχουν την έκφραση των μιτοχονδριακών OXPHOS γονιδίων. Η δράση αυτή προϋποθέτει την ύπαρξη ενός μηχανισμού, που συντονίζει την έκφραση του μιτοχονδριακού και πυρηνικού γονιδιώματος. Οι Sekeris et al. παρατήρησαν την ύπαρξη διάφορων

αλληλουχιών στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα, οι οποίες εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα με τη συναινετική αλληλουχία GRE.

Ο εντοπισμός του υποδοχέα στα μιτοχόνδρια, αλλά και η ανίχνευση της ειδικής σύνδεσης του υποδοχέα με τις μιτοχονδριακές DNA αλληλουχίες, οι οποίες εμφανίζουν ομοιότητα με τα πυρηνικά GREs, οδήγησε στη διερεύνηση του ρόλου του υποδοχέα στο «νέο» αυτό περιβάλλον. Πρόσφατα επιστημονικά δεδομένα αποδεικνύουν την εμπλοκή του μιτοχονδριακού υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στην ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής μεταγραφής και στην μιτοχονδριακά επαγόμενη απόπτωση. Ο χαρακτηρισμός των μορίων που αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα στο μιτοχονδριακό περιβάλλον είναι ιδιαίτερης σημασίας για την κατανόηση των μηχανισμών επίτευξης της δράσης του.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η σύνδεση και η αλληλεπίδραση συγκεκριμένων πρωτεϊνών με τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, οι οποίες έχουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφικής μηχανής και ελέγχου του μιτοχονδριακού μεταβολισμού. Για το σκοπό αυτό, τόσο σε ολικό εκχύλισμα κυττάρων ηπατοκαρκινώματος HepG2, όσο και σε μιτοχονδριακό εκχύλισμα κυττάρων ηπατοκαρκινώματος HepG2, που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με μιτοχονδριακή στόχευση, εκτελέστηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης του GR και ανοσοαποτύπωσης κατά Western των ανοσοκατακρημνισθέντων πρωτεϊνών με χρήση ειδικών αντισωμάτων. Αρχικά για τη διερεύνηση των μηχανισμών ελέγχου της μεταγραφικής ρύθμισης εξετάστηκε η πιθανότητα αλληλεπίδρασης του GR με τους μιτοχονδριακούς μεταγραφικούς παράγοντες, τον TFB1M, TFB2M, mTFA και mTERF. Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες έχουν λειτουργικό και όχι δομικό ρόλο στη μεταγραφική διαδικασία, γεγονός που δικαιολογεί και τα χαμηλά επίπεδα εντόπισής τους στο μιτοχονδριακό περιβάλλον. Ενδεχομένως, για το λόγο αυτό, η πιθανή συν-ανοσοκατακρήμνιση των συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων με τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, δεν κατέστη δυνατή, υπό τις συνθήκες του πειράματος.

Αντίστοιχη μελέτη διερεύνησης της πιθανής αλληλεπίδρασης του μιτοχονδριακού GR με την αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού (PDH), έδειξε αλληλεπίδραση των δύο μορίων τόσο σε ολικό εκχύλισμα κυττάρων ηπατοκαρκινώματος HepG2, όσο και σε μιτοχονδριακό εκχύλισμα κυττάρων ηπατοκαρκινώματος HepG2, που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με μιτοχονδριακή στόχευση. Σύμφωνα με το φαινόμενο Warburg σε πολλούς τύπους καρκινικών κυττάρων το ένζυμο αυτό είναι ανενεργό οδηγώντας στην εξοικονόμηση των απαραίτητων ενεργειακών αναγκών του καρκινικού κυττάρου μέσω της γλυκολυτικής πορείας, με παράλληλη εξοικονόμηση πρόδρομων βιοσυνθετικών μορίων, απαραίτητων για τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Η αλληλεπίδραση του μιτοχονδριακού

υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με την PDH αποκαλύπτει την ύπαρξη ενός νέου μηχανισμό ρύθμισης της δράσης του ενζύμου, δημιουργώντας προοπτικές μοριακής στόχευσης του μιτοχονδριακού υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών για τη ρύθμιση του ενεργειακού μεταβολισμού στα καρκινικά κύτταρα. Ο πλήρης χαρακτηρισμός των μορίων που αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα στο μιτοχονδριακό περιβάλλον συμβάλλει στην κατανόηση των μηχανισμών δράσης του με τελικό αποτέλεσμα την απόκτηση γνώσης, η οποία μπορεί να αξιοποιηθεί στη μελλοντική ανάπτυξη θεραπευτικών προσεγγίσεων στο καρκίνο χρησιμοποιώντας ως μόριο στόχο το μιτοχονδριακό υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### **1. ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ**

#### **1.1 ΓΕΝΙΚΑ**

Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος ενεργοποιείται με τη σύνδεση της αντίστοιχης ορμόνης (γλυκοκορτικοειδές). Ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων στεροειδών ορμονών, όπως επίσης και οι υποδοχείς των οιστρογόνων, προγεστερονών, ανδρογόνων και αλατοκορτικοειδών. Οι συγκεκριμένοι υποδοχείς παρουσιάζουν ομολογία σε συγκεκριμένες αλληλουχίες σύνδεσης στο DNA και λειτουργούν ως παράγοντες ρύθμισης της μεταγραφής.

#### **1.2 ΡΥΘΜΙΣΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ**

Η έκφραση των γενετικών πληροφοριών για τις κυριότερες διεργασίες στα κύτταρα των ευκαρυωτικών οργανισμών, όπως η διαφοροποίηση, η ανάπτυξη, η γήρανση, ο θάνατος αλλά και για διάφορες παθολογικές καταστάσεις, ελέγχεται συνήθως στο επίπεδο της μεταγραφής. Η γονιδιακή ρύθμιση περιλαμβάνει τη μεταγωγή πολλών διαφορετικών εξωκυτταρικών μηνυμάτων στον πυρήνα και τη συμμετοχή ειδικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ trans-ρυθμιστικών πρωτεϊνών και cis-ρυθμιστικών στοιχείων, που βρίσκονται είτε εντός είτε κοντά στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου στόχου. Οι μεταγραφικοί παράγοντες συνδέονται με τα αντίστοιχα ρυθμιστικά στοιχεία της αλληλουχίας-στόχου με αποτέλεσμα είτε την αύξηση, είτε τη μείωση του ρυθμού μεταγραφής του γονιδίου.

Ο μηχανισμός δράσης των στεροειδών ορμονών αποτελεί ένα πρότυπο συστήματος για τη μεταγραφική ρύθμιση στα ευκαρυωτικά κύτταρα.

#### **1.3 ΣΤΕΡΟΕΙΔΕΙΣ ΟΡΜΟΝΕΣ**

Έχουν περιγραφεί δύο μεγάλες κατηγορίες στεροειδών ορμονών: τα στεροειδή του φλοιού των επινεφριδίων (γλυκοκορτικοειδή και αλδοστερόνη) και τα φυλετικά στεροειδή (οιστρογόνα, προγεστερόνη και τεστοστερόνη). Επίσης, στην κατηγορία των στεροειδών ορμονών συγκαταλέγεται και η βιταμίνη D3, η οποία παρουσιάζει παρόμοιο μηχανισμό δράσης.

Τα στεροειδή των επινεφριδίων επηρεάζουν την ομοιόσταση, ρυθμίζουν το μεταβολισμό του γλυκογόνου και των πρωτεϊνών, ελέγχουν τη συγκέντρωση των



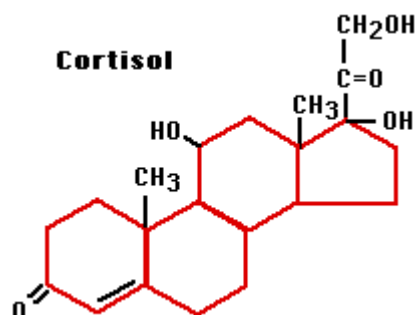
αλάτων και την ανταπόκριση στο stress. Επιδρούν στο ανοσοποιητικό και το νευρικό σύστημα και στην ανάπτυξη, στον πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση των κυττάρων.

Τα φυλετικά στεροειδή είναι υπεύθυνα για τον καθορισμό και την ανάπτυξη του εμβρυϊκού αναπαραγωγικού συστήματος, τον καθορισμό της ανδρικής ή της θηλυκής ταυτότητας κατά τη γέννηση, καθώς και τη φυλετική διαμόρφωση του αναπαραγωγικού συστήματος κατά την ενηλικίωση, μέσω της ανάπτυξης των δευτερευόντων φυλετικών χαρακτηριστικών.

Η βιταμίνη D αυξάνει τη μεταφορά και την αξιοποίηση του ασβεστίου. Για το λόγο αυτό είναι καθοριστική για τη φυσιολογική ανάπτυξη και διαφοροποίηση των οστών, καθώς και για το μεταβολισμό του ασβεστίου.

#### 1.4 ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ ΩΣ ΜΟΡΙΑ

Τα γλυκοκορτικοειδή, όπως και τα αλατοκορτικοειδή, τα ανδρογόνα, τα οιστρογόνα, η προγεστερόνη και η βιταμίνη D, ανήκουν στην κατηγορία των στεροειδών ορμονών οι οποίες έχουν ως κοινό στοιχείο ένα δακτύλιο στερανίου. Βιοχημικά, χαρακτηρίζονται ως μεταβολίτες της χοληστερόλης. Για το λόγο αυτό, έχουν λιπόφιλο χαρακτήρα και η μεταφορά τους μέσα στο αίμα γίνεται με τη βοήθεια πρωτεϊνών του πλάσματος, όπως η αλβουμίνη, στις οποίες είναι συνδεδεμένα. Έτσι, διευκολύνεται η είσοδος των μορίων αυτών στα κύτταρα στόχους, πιθανώς με τη διαδικασία της διάχυσης. Ακολούθως, γίνεται η σύνδεσή τους στους αντίστοιχους υποδοχείς με υψηλή χημική συγγένεια και τέλος επιδρούν στη ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων στόχων.



Εικόνα 1.1. Το μόριο της κορτιζόλης. Ο λιπόφιλος χαρακτήρας του γλυκοκορτικοειδούς αυτού είναι εμφανής. (Από Ingle DJ (October 1950). "The biologic properties of cortisone: a review". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 10 (10): 1312–54)

### 1.5 ΔΡΑΣΗ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ

Οι στεροειδείς ορμόνες δρουν διαμέσου της σύνδεσής τους σε ειδικές πρωτεΐνες μέσα στο κύτταρο. Οι πρωτεΐνες αυτές εμφανίζουν μεγάλη δομική και λειτουργική ομοιότητα και ανήκουν στην ομάδα των πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων και λειτουργούν ως πυρηνικοί υποδοχείς. Όταν πρόκειται για κύτταρα-στόχους μιας συγκεκριμένης ορμόνης, τα επίπεδα του αντίστοιχου υποδοχέα κυμαίνονται στα  $10^3$ - $10^6$  μόρια ανά κύτταρο, ενώ διαφέρει από ιστό σε ιστό, ανάλογα και με την ορμόνη.

Τα γλυκοκορτικοειδή, για να φτάσουν από τους ενδοκρινείς αδένες στα κύτταρα-στόχους, μεταφέρονται στο πλάσμα από ειδικά συνδεόμενες μεταφορικές γλυκοπρωτεΐνες. Τα ελεύθερα στεροειδή είναι λιπόφιλα με αποτέλεσμα να εισέρχονται στα κύτταρα με διάχυση ή με ενεργή μεταφορά. Ακολούθως, τα ελεύθερα γλυκοκορτικοειδή, αφού έχουν εισέρθει στο κύτταρο, συνδέονται με υψηλή συγγένεια και αντιστρεπτό τρόπο με τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR). Πρόκειται για μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, που ανήκει στην οικογένεια των ορμονο-εξαρτώμενων πρωτεϊνών, που είναι ρυθμιστές της μεταγραφής.

Μέσα στο κυτταρόπλασμα ο υποδοχέας βρίσκεται σε μορφή συμπλόκου με διάφορα άλλα μόρια. Η σύνδεση της ορμόνης στην ετεροπολυμερική μορφή του υποδοχέα προκαλεί τη διαδικασία της ενεργοποίησης κατά την οποία η δομή του υποδοχέα μεταβάλλεται αλλοστερικά. Έτσι, αμέσως μετά τη σύνδεση με την ορμόνη, το πολυμερές σύμπλοκο διασπάται και ο GR με την ενεργοποιημένη πλέον μορφή του διμερίζεται και εισέρχεται στον πυρήνα. Η ανενεργή μορφή του υποδοχέα, δηλαδή απουσία ορμονών, δεν είναι ισχυρά συνδεδεμένη με κάποια μεμβράνη ή πυρηνικά συστατικά. Αντιθέτως, η ενεργή μορφή, μετά τη σύνδεση της ορμόνης, παρουσιάζεται αύξηση της συγγένειας του υποδοχέα με πυρηνικά στοιχεία και συγκεκριμένα με τις περιοχές στο DNA, τα στοιχεία απόκρισης στην ορμόνη (HREs). Στην περίπτωση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, τα ορμονο-ανταποκρινόμενα στοιχεία ονομάζονται GREs. Ο υποδοχέας συνδέεται στα GREs και επιταχύνει ή επιβραδύνει το ρυθμό της μεταγραφής του γονιδίου στο οποίο τον υποκινητή βρίσκεται το αντίστοιχο GRE.

Τα γονίδια-στόχοι των γλυκοκορτικοειδών μεταξύ πολλών άλλων, είναι τα γονίδια της αμινοτρανσφοράς της τυροσίνης και της οξυγενάσης της τρυπτοφάνης στο ήπαρ, της μεταλλοθειονίνης και της αυξητικής ορμόνης του ανθρώπου, της λυσοζύμης του ωαγωγού κότας κ.α.

Υπάρχουν πολλές μελέτες που υποστηρίζουν ότι εκτός από την επαγόμενη γονιδιακή δραστηριότητα στον πυρήνα, τα γλυκοκορτικοειδή σχετίζονται και με άλλες γονιδιακές επιδράσεις, αφού αποτελούν ρυθμιστικούς παράγοντες έκφρασης

εξωπυρηνικών γονιδίων και συγκεκριμένα μιτοχονδριακών γονιδίων. Η δράση αυτή είναι αντικείμενο της παρούσας εργασίας.

#### 1.6 ΔΟΜΗ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ

Οι πυρηνικοί υποδοχείς συνδέουν ένα μεγάλο φάσμα κυτταρικών ρυθμιστικών στοιχείων όπως τις στεροειδείς ορμόνες, τη βιταμίνη D, τις θυροειδείς ορμόνες και τα ρετινοειδή. Ανάμεσα στον υποδοχέα και στο ρυθμιστικό μόριο αναπτύσσονται διάφορων ειδών δεσμοί όπως ομοιοπολικοί, ετεροπολικοί, υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, δεσμοί διπόλου-διπόλου, ιόντος-διπόλου και δεσμοί υδρογόνου. Οι υποδοχείς αυτοί βρίσκονται στο εσωτερικό του κυττάρου και όχι συνδεδεμένοι στην κυτταρική μεμβράνη. Μετά τη σύνδεση με την αντίστοιχη ορμόνη, το σύμπλοκο αυτό δρα ως μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση.

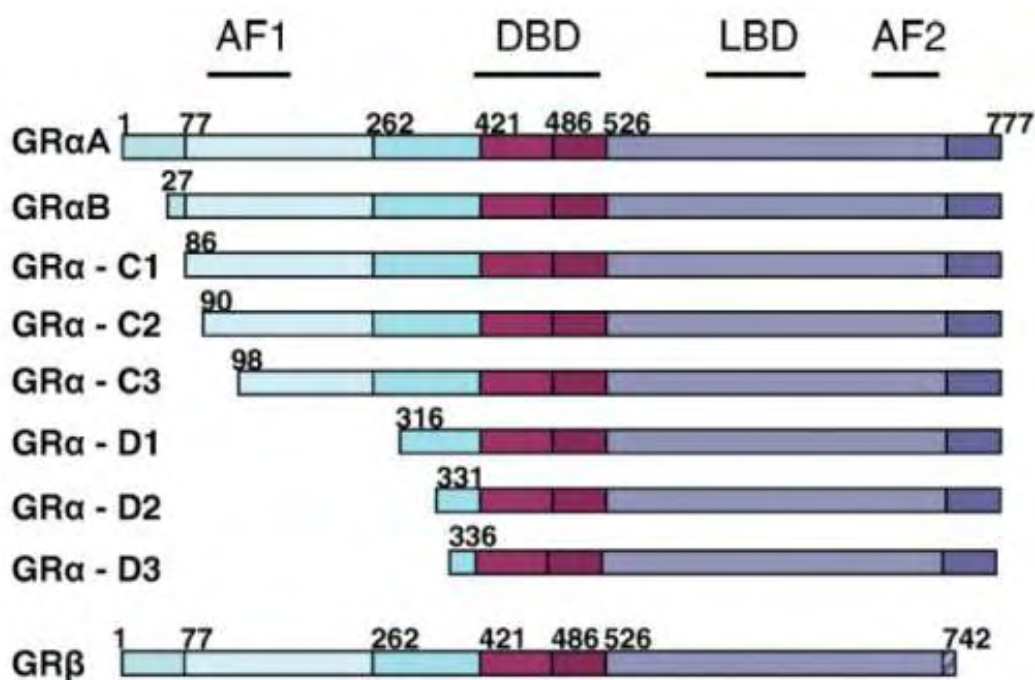
Η υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων διακρίνεται από τα ακόλουθα χαρακτηριστικά. Αν και το μήκος τους ποικίλει από 425 μέχρι και 984 αμινοξέα, έχουν όμοιες λειτουργικές περιοχές. Κάθε πυρηνικός υποδοχέας περιέχει μια περιοχή μήκους 66-68 αμινοξέα, η οποία έχει την ικανότητα να συνδέεται στο DNA. Πρόκειται για μια συντηρημένη περιοχή, πλούσια σε αμινοξέα κυστεΐνης, λυσίνης και αργινίνης, η οποία εντοπίζεται στο κεντρικό τμήμα του υποδοχέα. Ανάμεσα στους υποδοχείς της υπεροικογένειας η ομοιότητα για την περιοχή αυτή ποικίλει από 42-94%. Υπάρχει μικρότερη ομοιότητα για το τμήμα στο οποίο συνδέεται η ορμόνη και ακόμα λιγότερη για την αμινοτελική περιοχή. Οι περιοχές αυτές αποτελούν τα στοιχεία διάκρισης των υποδοχέων ανάμεσα στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων.

#### 1.7 ΔΟΜΗ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ

Η κλωνοποίηση του cDNA του ανθρώπινου υποδοχέα καθώς και του υποδοχέα του ποντικού και του αρουραίου (Hollenberg et al., 1985, Danielsen et al., 1986 και Miesfeld et al., 1986, αντίστοιχα) παρείχε στην επιστημονική κοινότητα αρκετές πληροφορίες για τη δομή του μορίου του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Οι υποδοχείς του αρουραίου αποτελούνται από 795 αμινοξέα ενώ του ποντικού από 783 αμινοξέα. Στην περίπτωση του ανθρώπινου υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, απομονώθηκαν δύο κλώνοι που αντιστοιχούν σε δύο μορφές πρωτεΐνης, τον GRα και τον GRβ, που αποτελούνται από 777 και 742 αμινοξέα αντίστοιχα. Πρόκειται για δύο προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος και δεν παρουσιάζουν σημαντική ομολογία μετά το αμινοξύ 727, καθώς επίσης περιέχουν διαφορετικά ανοικτά πλαίσια

μετάφρασης στα καρβοξυτελικά τους άκρα, ενώ το ανθρώπινο γονίδιο του υποδοχέα εντοπίστηκε στο χρωμόσωμα 5.

Ανάλυση της δομής του γονιδίου του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών έδειξε ότι αποτελείται από 10 εξόνια. Οι δύο μορφές του υποδοχέα GRα και GRβ κωδικοποιούνται από εννέα εξόνια από τα οποία τα οκτώ πρώτα είναι κοινά (1-8) ενώ το ένατο διαφοροποιείται (9α και 9β, αντίστοιχα). Το εξόνιο 1 δεν μεταφράζεται, το 2 κωδικοποιεί το αμινοτελικό τμήμα (τμήμα C), τα 3 και 4 κωδικοποιούν τους δακτύλους ψευδαργύρου (τμήμα B), τα εξόνια 5-8 και το 5' άκρο του 9, το οποίο διαφοροποιείται μεταξύ των δύο μορφών α και β και επιπλέον περιέχει 3' μη μεταφραζόμενες αλληλουχίες, κωδικοποιούν το τμήμα C. Σύνδεση της ορμόνης είναι δυνατή μόνο στην περίπτωση της μορφής α. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε η ύπαρξη 7 τουλάχιστον επιπλέον ισομορφών τόσο για την άλφα όσο και της βήτα μορφής του υποδοχέα, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. Αυτές αποτελούν προϊόντα διαφορετικού σημείου έναρξης της μεταγραφής του ίδιου mRNA (Lu NZ, Cidlowski JA, 2006, Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificit



Εικόνα 1.2. Σχηματική απεικόνιση της δομής των ισομορφών του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. (Από Psarra et al., 2008, IUBMB Life 60, 210-223).

Όταν η μελέτη του υποδοχέα βρισκόταν στα αρχικά της στάδια, κυριαρχούσαν οι διαδικασίες απομόνωσης και καθαρισμού με χρωματογραφίες μεθόδους (Govindan και Sekeris 1978, Wrange et al., 1979, 1984, Eisen και Glinsmann 1978). Οι μέθοδος καθαρισμού σε συνδυασμό με μεθόδους μερικής πρωτεόλυσης του μορίου

επέτρεψαν τον εντοπισμό τριών λειτουργικών τμημάτων του μορίου του υποδοχέα. Δύο από τις περιοχές αυτές είναι πολύ ευαίσθητες στην πρωτεόλυση από εξωγενείς πρωτεάσες όπως η θρυψίνη και η χυμοθρυψίνη. Μετά από την πέψη με τα ένζυμα αυτά, η πρωτεΐνη χωρίζεται σε τρία λειτουργικά τμήματα (domains):

A: τμήμα σύνδεσης του στεροειδούς (steroid-binding domain)

B: τμήμα σύνδεσης στο DNA (DNA-binding domain)

C: τμήμα ρύθμισης της μεταγραφής (transactivation domain)

Εντοπίστηκαν επίσης οι εξής περιοχές:

NL<sub>1</sub> και NL<sub>2</sub>: περιοχές για τον πυρηνικό εντοπισμό

τ<sub>1</sub> και τ<sub>2</sub>: περιοχές για την ενεργοποίηση της μεταγραφής

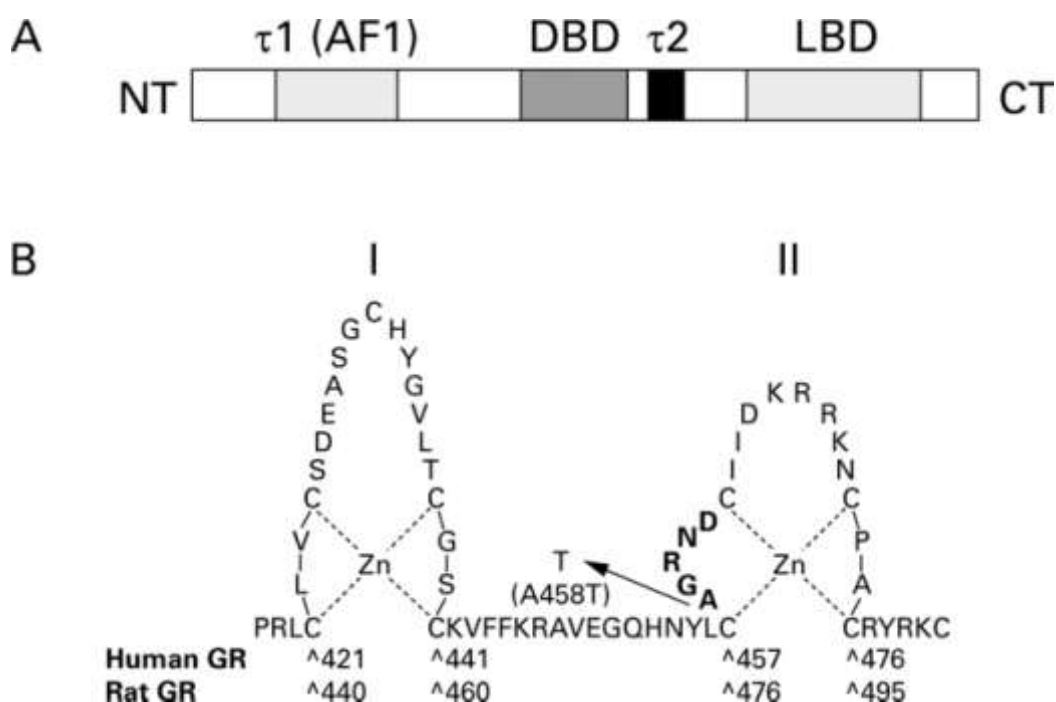
Με κατεργασία με θρυψίνη λαμβάνεται το υδρόφοβο τμήμα A, το οποίο περιλαμβάνει την περιοχή σύνδεσης του γλυκοκορτικοειδούς. Η περιοχή αυτή αντιστοιχεί στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης και έχει μοριακό βάρος 25-27kDa. Με κατεργασία με χυμοθρυψίνη λαμβάνεται ένα πεπτίδιο που αποτελείται από τα τμήματα A και B, με μοριακό βάρος 39kDa. Το τμήμα B αντιστοιχεί στην περιοχή σύνδεσης στο DNA (DNA-binding domain) και βρίσκεται ανάμεσα στα τμήματα A και C, είναι υδρόφιλη και περιέχει μια περιοχή 66 αμινοξέων, πλούσια σε κυστεΐνη, η οποία αποτελεί το σημείο επαφής με τις αλληλουχίες του DNA που είναι απαραίτητες για την ορμονοεξαρτώμενη έναρξη της μεταγραφής.

Το μισό μόριο της πρωτεΐνης καταλαμβάνεται από το τμήμα C με 400 περίπου αμινοξέα. Περιέχει τα κύρια αντιγονικά κέντρα και η λειτουργία του θεωρείται ότι περιορίζεται στην ενίσχυση της μεταγραφής μέσω αλληλεπίδρασης με άλλους πρωτεϊνικούς παράγοντες (τμήμα ρύθμισης της μεταγραφής, transactivation domain). Επιπλέον, ο υποδοχέας περιλαμβάνει, εκτός των τριών τμημάτων, και λειτουργικές περιοχές, υπεύθυνες για την ενεργοποίηση της μεταγραφής, την μετατόπιση στον πυρήνα, το διμερισμό κ.α.

Η σύνδεση του υποδοχέα στο DNA γίνεται μέσω δύο θηλιών στο τμήμα σύνδεσης στο DNA. Στο κέντρο κάθε θηλιάς, συνδεδεμένο με τέσσερις κυστεΐνες σε διάταξη τύπου κυστεΐνη-χ<sub>2</sub>-κυστεΐνη, όπου χ τυχαίο αμινοξύ, υπάρχει ένα ιόν ψευδαργύρου (Zn<sup>2+</sup>). Οι θηλιές αυτές ονομάζονται zinc fingers. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι υποδοχείς που φέρουν μετάλλαξη στην περιοχή κυστεΐνη-χ<sub>2</sub>-κυστεΐνη συνδέουν την ορμόνη αλλά δεν συνδέονται στο DNA. Ανάμεσα στα διάφορα είδη, το τμήμα B είναι αρκετά διατηρημένο και εξειδικεύεται στην αλληλεπίδραση με το GRE, με βάση τρία αμινοξέα (γλυκίνη 439, σερίνη 440, βαλίνη 443) του πρώτου zinc finger.

Με τη βοήθεια μεταλλαγών κλωνοποιημένου DNA στο μόριο της πρωτεΐνης εντοπίστηκαν δύο πυρηνικά σήματα, το NL<sub>1</sub> και το NL<sub>2</sub>. Τα σήματα εντοπισμού του πυρήνα είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά της πρωτεΐνης στον πυρήνα του κυττάρου, διευκολύνοντας τη διάχυση του υποδοχέα είτε αλληλεπιδρώντας με κάποιο μηχανισμό ενεργής μεταφοράς. Η θέση του NL<sub>1</sub> εντοπίσθηκε ανάμεσα στο τμήμα A, όπου συνδέεται το στεροειδές και στο τμήμα B που συνδέεται στο DNA. Το NL<sub>2</sub> εντοπίστηκε μέσα στο τμήμα A χωρίς να εντοπισθεί η ακριβής θέση του.

Έχουν βρεθεί επιπλέον δύο περιοχές, η τ<sub>1</sub> και η τ<sub>2</sub>, στις οποίες εντοπίζεται η λειτουργία του υποδοχέα σαν ενεργοποιητή της μεταγραφής. Η τ<sub>1</sub> βρίσκεται στο αμινοτελικό τμήμα C του μορίου μεταξύ των αμινοξέων 77 και 262 του υποδοχέα και περιέχει σχετικά υψηλό ποσοστό δύο αμινοξέων, ασπαρτικού και γλουταμικού. Η αφαίρεση της μειώνει τη μεταγραφική ενεργοποίηση κατά 95% σε σχέση με αυτή του φυσικού υποδοχέα, ενώ ο διπλασιασμός της την αυξάνει κατά 310%. Η περιοχή τ<sub>2</sub> περιλαμβάνει τα αμινοξέα 526-556 και βρίσκεται μεταξύ του τμήματος σύνδεσης στο DNA και του ενεργού κέντρου σύνδεσης της ορμόνης. Η λειτουργία της περιοχής τ<sub>1</sub> δεν εξαρτάται από την παρουσία ορμόνης ενώ αυτή της τ<sub>2</sub> εξαρτάται απόλυτα κι αυτό συμφωνεί με τη μεταγραφική ενεργότητα ελλείψεων του τμήματος σύνδεσης ορμόνης. Ειδικά για την τ<sub>1</sub> έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά άμεσα με τη βασική μεταγραφική μηχανή μέσω των παραγόντων TAF, των πρωτεϊνών δηλαδή που συνδέονται στην πρωτεΐνη TBP (συνδέεται στο στοιχείο TATA) και μαζί της συνιστούν τον παράγοντα μεταγραφής TFIIID, σταθεροποιώντας με τον τρόπο αυτό το σύμπλοκο έναρξης της μεταγραφής στο οποίο συμμετέχει και η RNAπολυμεράση II.



Εικόνα 1.3. Δομή του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. (Από Newton Robert (2000). *Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important?* Thorax 2000;55:603-613)

(Α) Γραμμική αναπαράσταση του υποδοχέα με τις κύριες περιοχές του, ο οποίος αποτελείται από 777 αμινοξέα.

DBD = DNA binding domain; περιοχή πρόσδεσης στο DNA

LBD = ligand binding domain; περιοχή πρόσδεσης ορμόνης

$\tau_1$  και  $\tau_2$  = περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής;

NT = αμινοτελικό άκρο;

CT = καρβοξυτελικό άκρο.

(Β) Μεγέθυνση της περιοχής DBD η οποία παρουσιάζει την αμινοξική αλληλουχία των δύο δακτυλίων ψευδαργύρου (zinc fingers) και της θηλιάς. Δίνεται η αρίθμηση για τον υποδοχέα του ανθρώπου και του αρουραίου. Η μετάλλαξη από A σε T στη θέση 458 αποδίδει την αποτελεσματικότητα του υποδοχέα για διμερισμό.

### 1.8 ΤΕΤΑΡΟΤΑΓΗΣ ΔΟΜΗ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ

Ο ελεύθερος υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών εντοπίζεται στο κυτοσόλιο και δεν συνδέεται στο DNA. Παρουσία της ορμόνης μετατρέπεται σε πυρηνική πρωτεΐνη ικανή στο να συνδέεται στο DNA και να επιδρά στη μεταγραφή μιας σειράς γονιδίων που δεν ξεπερνά το ~10% του συνόλου των εκφραζόμενων γονιδίων ενός διαφοροποιημένου κυττάρου.

Το σύμπλοκο του υποδοχέα περιλαμβάνει εκτός από την πρωτεΐνη που συνδέει τη στεροειδή ορμόνη και άλλες πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα υπάρχει μια μόνο υπομονάδα που συνδέει ορμόνη ανά μόριο υποδοχέα, η οποία έχει μοριακό βάρος ~100kDa. Με τη μέθοδο της σήμανσης ινοβλαστών ποντικού με  $^{32}\text{P}$ , αποδείχτηκε η ύπαρξη μια φωσφοπρωτεΐνης με μοριακό βάρος ~90kDa, η οποία δε συνδέει ορμόνη και αποσπάται μετά το διμερισμό του υποδοχέα. Η στοιχειομετρία της είναι δύο μόρια για κάθε ένα μόριο υπομονάδας που συνδέει ορμόνη. Με τη βοήθεια ανοσολογικών τεχνικών η φωσφοπρωτεΐνη αυτή ταυτίστηκε με την πρωτεΐνη θερμικού σοκ, την hsp90.

Ο ρόλος της hsp90 στη δομή του ελεύθερου, μη μετασχηματισμένου υποδοχέα δεν περιορίζεται μόνο στην επίτευξη και στη διατήρηση της διαμόρφωσης που συνδέει την ορμόνη με υψηλή συγγένεια αλλά επιπλέον στην απελευθέρωση της μεταγραφικά ενεργής διαμόρφωσης μετά τη σύνδεση της ορμόνης.

Το ελεύθερο από ορμόνη σύμπλοκο του υποδοχέα έχει πυρήνα με τη δομή τετραμερούς. Εκτός από την πρωτεΐνη σύνδεσης της ορμόνης και τα 2 μόρια hsp90, έχει εντοπισθεί και η τέταρτη πρωτεΐνη, που πρόκειται για μια πρωτεΐνη μοριακό βάρος ~50kDa, την p59 (FKBP54), μια πεπτιδυλ-προπυλ-ισομεράση, ροταμάση ή μπορεί να είναι επίσης η ομόλογή της, η FKBP54 (MB~55-59) είτε η CyP-40 (MB~40). Στο σύνολο του συμπλόκου του υποδοχέα περιλαμβάνονται επιπλέον πρωτεΐνες hsp90, καθώς και άλλες πρωτεΐνες όπως η hsp70.

### 1.9 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ

Ο μετασχηματισμός του υποδοχέα προκαλείται από τη σύνδεση της ορμόνης και μετατρέπεται σε διμερές, αφού αποσυνδέεται η hsp90 και οι υπόλοιπες υπομονάδες που είναι ενωμένες με αυτόν. Ακολούθως μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου συνδέεται στις ειδικές αλληλουχίες GREs που υπάρχουν στην ευρύτερη περιοχή των γονιδίων-στόχων της ορμόνης. Μελέτες με πειράματα *in vitro* έδειξαν τη σύνδεση του μετασχηματισμένου υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με ινίδια ακτίνης και τουμπουλίνης μέσω της hsp90 (Miyata and Yahara, 1991 και Sanchez et al., 1988). Συγκεκριμένα, ο μετασχηματισμένος υποδοχέας αλληλεπιδρά με μικροσωληνίσκους για τη μετατόπισή του στον πυρήνα παρουσία ορμόνης. Κατά το μετασχηματισμό στο κυτοσόλιο, ο διαλυτός υποδοχέας με συντελεστή καθίζησης 9S μετατρέπεται σε μορφή κυρίως μονομερούς με συντελεστή καθίζησης περίπου 4S, είτε σε διμερές με την hsp70 ή και σε μικρό βαθμό σε ομοδιμερές. Η δομή ομοδιμερούς σταθεροποιείται από την ορμόνη. Μετά το μετασχηματισμό του υποδοχέα, μειώνεται η χημική συγγένεια για την ορμόνη.

Με την αποσύνδεση της hsp90 κατά το μετασχηματισμό του υποδοχέα, αποκαλύπτεται το σήμα πυρηνικής εντόπισης του υποδοχέα NLS1 και με τον τρόπο αυτό επιτρέπεται η μετατόπισή του στον πυρήνα. Μορφές του υποδοχέα, οι οποίες στερούνται τα τελευταία 200 αμινοξέα στο καρβοξυτελικό άκρο που ενέχονται στη σύνδεση της hsp90, με αποτέλεσμα να μην καλύπτεται το NLS1, είναι μεταγραφικά ενεργές. Ο ρόλος λοιπόν της hsp90 συμπεριλαμβάνει την καταστολή (απουσία ορμόνης) της μεταγραφικής ενεργότητας του υποδοχέα και όχι την πυρηνική εντόπιση.

Επιπλέον, με τη σύνδεση της ορμόνης στον υποδοχέα, μεταβάλλεται η φωσφορυλίωσή του, η οποία αυξάνεται κατά 2-7 φορές στα 7 αμινοξέα του αμινοτελικού άκρου και στην περιοχή σύνδεσης στο DNA. Η επίδραση της φωσφορυλίωσης στη μεταγραφική ενεργότητα του υποδοχέα δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί.



### 1.10 ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ ΣΤΟ ΠΥΡΗΝΑ

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, η εντόπιση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών εξαρτάται από την ορμόνη, η οποία αποκαλύπτει τα σήματα πυρηνικής εντόπισης με τη διάσταση του μη μετασχηματισμένου υποδοχέα από την hsp90. Η διάσταση αυτή μπορεί να αποκαλύπτει δύο σήματα, είτε το ισχυρό NLS1, το οποίο είναι από μόνο του ενεργό με αυτόματη διάσταση, είτε το NLS2 το οποίο ενεργοποιείται από την ορμόνη. Η ορμόνη ενεργοποιεί και τα δύο σήματα πυρηνικής εντόπισης. Σε κάθε περίπτωση, ο υποδοχέας μετατοπίζεται στον πυρήνα. Αντίθετα, η σύνδεση της hsp90, καλύπτει το σήμα NLS1 και αλλάζει τη διαμόρφωση του σήματος NLS2, με αποτέλεσμα την κυτταροπλασματική εντόπιση του υποδοχέα.

Ο βαθμός της πυρηνικής εντόπισης του υποδοχέα αντανακλά το βαθμό αστάθειας της δομής του με την hsp90 και αυτόν της σταθερότητας του ομοδιμερούς απουσία της ορμόνης. Επιπλέον, είναι πιθανή η συμμετοχή της hsp70 στην είσοδο του υποδοχέα στον πυρήνα μέσω της απόδοσής του σε συγκεκριμένους υποδοχείς για πρωτεΐνες με σήματα πυρηνικής εντόπισης (NLS-υποδοχείς) στο κυτταρόπλασμα, στον πυρηνικό φάκελο και στους πυρηνικούς πόρους. Μελέτες υποστηρίζουν τη συμμετοχή της hsp70 και στην έξοδο του υποδοχέα από τον πυρήνα μέσω των σημάτων εξόδου από τον πυρήνα (NES, nuclear export signals) (Gerace, 1995).

Η μεταφορά του υποδοχέα στον πυρήνα γίνεται με τη συμβολή του κυτταροσκελετού, μέσω της αλληλεπίδρασης της hsp90 με την τουμπουλίνη και την ακτίνη καθώς και με την κυτταροσκελετική εντόπιση της p59 και του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.

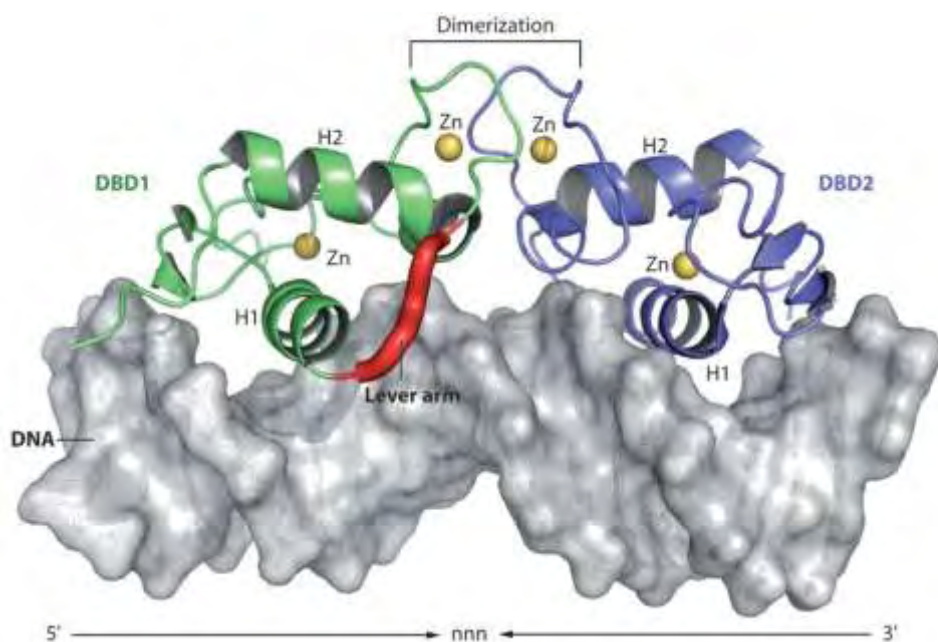
### 1.11 ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ ΣΤΟ DNA

Μετά το μετασχηματισμό του υποδοχέα σε ορμονικά σταθερό ομοδιμερές, ακολουθεί η μετατόπιση του κυτταροπλασματικού διμερούς στον πυρήνα και η σύνδεσή του στο DNA. Οι ειδικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες GREs (glucocorticoid responsive elements, στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή), στις οποίες συνδέεται ο υποδοχέας, ρυθμίζουν (ενισχύουν ή αναστέλλουν) τη λειτουργία των προαγωγών (promoters) των γονιδίων-στόχων των γλυκοκορτικοειδών.

Η καλύτερα χαρακτηρισμένη δομή GRE είναι αυτή της μακράς τελικής επανάληψης LTR (long terminal repeat) του ογκογόνου ιού του μαστικού αδένου ποντικού (MMTV, mouse mammary tumor virus). Η δομή του GRE αποτελείται από ένα διατηρημένο ολιγονουκλεοτίδιο έξι βάσεων, τρεις μη διατηρημένες βάσεις και ένα άλλο εξανουκλεοτίδιο λιγότερο διατηρημένο (παλίνδρομο GGTCACNNNTGTTCT, όπου N οποιαδήποτε βάση). Τα δύο μονομερή του GR, τα οποία σχηματίζουν ένα

ομοδιμερές με αντίθετη κατεύθυνση, αλληλεπιδρούν με το κάθε μισό του παλίνδρομο GRE.

Συγκεκριμένα, ο υποδοχέας αναγνωρίζει τις γουανίνες από τη μη κωδική παλίνδρομη αλληλουχία. Επιπλέον, το μόριο του υποδοχέα αλληλεπιδρά και με τις θυμίνες της μη κωδικής αλυσίδας της παλίνδρομης αλληλουχίας. Όσον αφορά τον τρόπο σύνδεσης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στο DNA, ο υποδοχέας συνδέεται στο κύριο αυλάκι της διπλής έλικας του DNA ως διμερές. Ο πρώτος δακτύλιος, προς το αμινοτελικό άκρο της περιοχής σύνδεσης στο DNA, είναι υπεύθυνος για την ειδική σύνδεση στο μισό GRE. Τα τρία αμινοξέα στο καρβοξυτελικό άκρο του δακτυλίου αυτού (κατάλοιπα γλυκίνης 439, σερίνης 440, βαλίνης 443) είναι αρκετά για να εξασφαλίσουν την ειδικότητα της σύνδεσης. Ο δεύτερος δακτύλιος, προς το καρβοξυτελικό άκρο του μορίου, σταθεροποιεί την παραπάνω αλληλεπίδραση και επιπλέον εμπλέκεται στη διάκριση μεταξύ GRE και ERE ή TRE (αλληλουχίες σύνδεσης του υποδοχέα οιστρογόνων και θυροξίνης αντίστοιχα).



Εικόνα 1.4. Κρυσταλλογραφική δομή του διμερούς του δακτυλίου ψευδαργύρου, το οποίο περιέχει DBD του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (πάνω) που προσδένεται στο DNA (κάτω). Τα άτομα ψευδαργύρου φαίνονται με κίτρινα σφαιρίδια. (Από Gronemeyer and Bourguet (2009). *Allosteric Effects Govern Nuclear Receptor Action: DNA Appears as a Player*. *Sci. Signal.* 2, pe34).

Η τριτοταγής δομή του τμήματος σύνδεσης στο κύριο αυλάκι του DNA, είναι μια περιοχή (κατάλοιπα σερίνη 436 έως γλουταμίνη 450) μεταξύ των δύο δακτυλίων με δομή α-έλικας. Ο τρόπος με τον οποίο το διμερές του υποδοχέα τοποθετείται στο GRE φέρνει πολύ κοντά τα κατάλοιπα προς το αμονοτελικό άκρο του δεύτερου δακτυλίου, ενώ όπως και η δεύτερη α-έλικα τοποθετούνται μακριά από το DNA, έτσι ώστε να μπορούν να αλληλεπιδρούν με μεταγραφικούς παράγοντες και να ρυθμίζουν την έναρξη της μεταγραφής.

Στο σύμπλοκο διμερούς-GRE σχηματίζονται δεσμοί υδρογόνου και δυνάμεις van der Waals για τη σταθεροποίηση της αλληλεπίδρασης. Ο διμερισμός του τμήματος σύνδεσης του υποδοχέα στο DNA ευνοείται από τη σύνδεση στο GRE πιθανόν επειδή η σύνδεση αυτή απαιτεί συγκεκριμένη διεύθυνση των υπομονάδων του διμερούς, και επιπλέον η αλληλεπίδραση του δεύτερου δακτυλίου με το φωσφοδιεστερικό δεσμό φαίνεται να σταθεροποιεί τη διαμόρφωση που οδηγεί σε διμερισμό. Με τον τρόπο αυτό η σύνδεση της πρώτης υπομονάδας στο GRE ευνοεί τη σύνδεση και της δεύτερης.

#### 1.12 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΑΠΟ ΤΟΝ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ

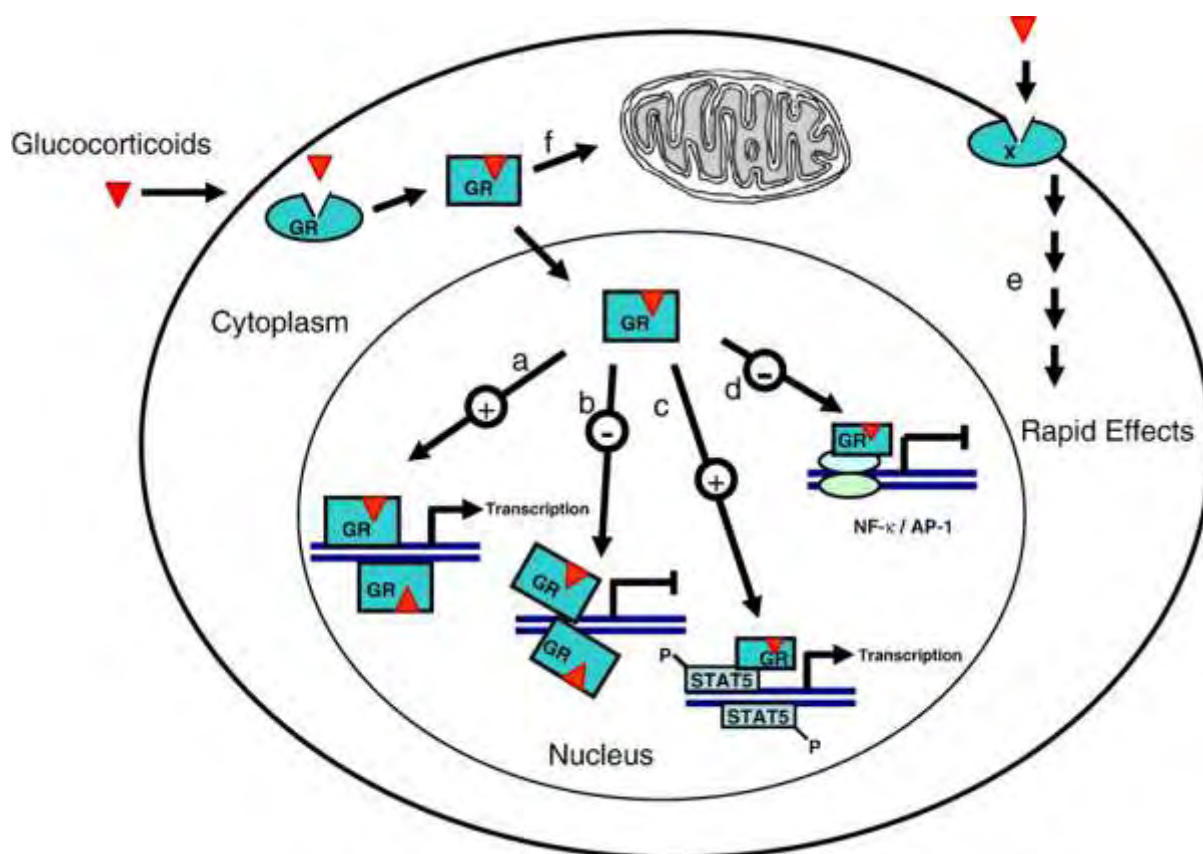
Η φυσιολογική λειτουργία όλων των ενισχυτών, συμπεριλαμβανομένων και των στεροειδο-ανταποκρινόμενων στοιχείων, είναι να συνδέονται και να μεσολαβούν στη δράση ειδικών μεταγραφικών ρυθμιστικών πρωτεϊνών, οι οποίες είναι λειτουργικά ανάλογες με τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Οι ενισχυτές μπορούν με μια συγκεκριμένη διαμόρφωσή τους και με τη μεταβολή της χρωματίνης, να ευνοήσουν τη δράση του υποκινητή, επιτρέποντας την προσέγγισή του από την RNA πολυμεράση ή κάποιους παράγοντες μεταγραφής. Περιοχές της χρωματίνης κοντά σε ενισχυτές, είναι ευαίσθητες στην DNase I και άλλες νουκλεάσες και συνδέονται με ειδικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ υποδοχέα και DNA δημιουργούν ενεργούς μεταγραφικούς ενισχυτές προκαλώντας μεταβολή της δομής της χρωματίνης

Η μεταγραφική ρύθμιση είναι αυστηρά περιορισμένη στο ρυθμό έναρξης της μεταγραφής, καθώς δεν υπάρχουν εμφανείς μεταβολές του ρυθμού επιμήκυνσης της μεταγραφής, της σταθερότητας του RNA, της επεξεργασίας του mRNA και της πολυαδενυλίωσης. Ο GR πιθανόν σταθεροποιεί τα σύμπλοκα μεταξύ των παραγόντων μεταγραφής και του υποκινητή. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεΐνης-DNA και πρωτεΐνης-πρωτεΐνης είναι απαραίτητες για το παρατηρούμενο αποτέλεσμα. Εκτός από τις αλληλουχίες του GR, που συνδέονται με το DNA και άλλες περιοχές του είναι απαραίτητες προκειμένου να επιτευχθεί μεταγραφική ρύθμιση. Έχει παρατηρηθεί ότι οι περιοχές αυτές περιέχουν κυρίως όξινα αμινοξέα

(γλουταμινικό, ασπαρτικό). Τα όξινα αμινοξέα αλληλεπιδρούν με την επαναλαμβανόμενη πενταπεπτιδική ουρά του μορίου της RNA πολυμεράσης II και με τον τρόπο αυτό αυξάνουν τη συχνότητα έναρξης της μεταγραφής (M. Beato, A. Sanchez-Pacheco, 1996, Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex).

Η ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής από τον GR είναι μια περίπλοκη διαδικασία, η οποία γίνεται με διάφορους μηχανισμούς:

- 1) Οι αλληλεπιδράσεις GR-GRE μπορεί να έχουν ως συνέπεια κάποια μεταβολή στην ακετυλίωση ιστονών, η οποία είναι πολύ σημαντική για τη μεταγραφική επαγωγή.
- 2) Οι δομικές μεταβολές, οι οποίες αντιστοιχούν στην ενεργοποίηση του ενισχυτή, μπορεί να είναι αποτέλεσμα της μεθυλίωσης του DNA. Φαίνεται όμως περισσότερο πιθανό ότι, η μεθυλίωση είναι δευτερεύουσα συνέπεια, προκειμένου να ανασταλούν ή να εκφραστούν συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος.
- 3) Μεταβολές στο βαθμό υπερελίκωσης του DNA.



Εικόνα 1.5. Μηχανισμοί δράσης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Τα γλυκοκορτικοειδή μέσω της πρόσδεσης τους στους υποδοχείς και της αλληλεπίδρασης τους με τα στοιχεία απόκρισης στις ορμόνες, *Hormone Response Elements (HREs)*, μπορούν είτε να α) ενεργοποιήσουν είτε β) να αναστείλουν τη

μεταγραφή. Επίσης, μέσω της αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης του συμπλόκου ορμόνης υποδοχέα με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες η ορμόνη μπορεί είτε c) να ενεργοποιήσει είτε d) να μπλοκάρει τη μεταγραφή. Η ορμόνη επίσης μπορεί να οδηγήσει σε γρήγορες, μη γονιδιωματικές, επιδράσεις (e) μέσω της κλασικής οδού των μεμβρανικών υποδοχέων, των G-πρωτεϊνών ή ακόμα και σε απροσδιόριστα για την ώρα μόρια και μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Στα μιτοχόνδρια (f), το σύμπλοκο ορμόνης υποδοχέα σε αλληλεπίδραση με το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, μπορεί να ρυθμίσει τη μιτοχονδριακή μεταγραφή. (Από Psarra et al.,2008, BBA 5, 431-436).

### 1.13 ΘΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ

Η τοπολογία του DNA παίζει κάποιο ρόλο στην επαγωγή της μεταγραφής από τις ορμόνες και τη σύνδεση του GR στο DNA. Πιο συγκεκριμένα, η υπερελίκωση του DNA επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση. Το γονίδιο *surX* του *E.coli* κωδικοποιεί το ένζυμο τοποϊσομεράση I, το οποίο μεταβάλλει το ρυθμό υπερελίκωσης του DNA. Μερικοί υποκινητές, όπως ο *lac*, εμφανίζονται δραστικοί μόνο όταν το DNA είναι αρνητικά υπερλίκωμένο. Η τοποϊσομεράση χαλαρώνει την αρνητική υπερελίκωση και με τον τρόπο αυτό καθιστά τον υποκινητή *lac* λιγότερο αποτελεσματικό. Έτσι, μεταλλάξεις στο γονίδιο *surX*, οι οποίες απενεργοποιούν την τοποϊσομεράση I, έχουν ως συνέπεια μεγαλύτερο βαθμό αρνητικής υπερελίκωσης και αποτελεσματικότερη μεταγραφή.

Ένας πιθανός μηχανισμός της επαγωγής της μεταγραφής είναι ότι η αρνητική υπερελίκωση του μορίου του DNA έχει ως συνέπεια τη σύνδεση του GR με το DNA ή δομική μεταβολή της διπλής έλικας, προκαλώντας αυξημένη συχνότητα έναρξης της μεταγραφής. Η αλλαγή της δομής της έλικας επιτρέπει σε κάποιες ρυθμιστικές πρωτεΐνες να συνδεθούν στο DNA. Οι στεροειδείς υποδοχείς αλληλεπιδρούν με ένζυμα του τύπου της τοποϊσομεράσης II, με τρόπο που καθιστά τα GRE δραστικούς ενισχυτές.

Οι γενικοί μηχανισμοί με τους οποίους η ειδική σύνδεση του συμπλόκου του στεροειδούς υποδοχέα στη ρυθμιστική περιοχή οδηγεί στην αύξηση της συχνότητας έναρξης της μεταγραφής, συνοψίζονται ως εξής:

- 1) Τα σύμπλοκα GR-DNA απελευθερώνουν τον υποκινητή από κάποιον αρνητικό παράγοντα, πιθανώς με την απομάκρυνση μιας πρωτεΐνης-αναστολέα,. Έτσι αυξάνουν την αποτελεσματικότητα του υποκινητή.
- 2) Άμεσες αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, μεταξύ συμπλόκου υποδοχέα-ορμόνης και RNA πολυμεράσης διεγείρουν τη δράση της πολυμεράσης.

3) Τοπική αναδίπλωση του DNA, κοντά στην περιοχή σύνδεσης της RNA πολυμεράσης, αυξάνει την αποτελεσματικότητα της σύνδεσης μεταξύ πολυμεράσης και υποκινητή.

4) Τα σύμπλοκα υποδοχέα-ορμόνης μεταβάλλουν τη διαμόρφωση του DNA στη ρυθμιστική περιοχή, με τέτοιο τρόπο, ώστε να διευκολύνουν την είσοδο μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι μπορούν να ολισθαίνουν πάνω στο DNA και προς τις δύο κατευθύνσεις προς αναζήτηση μορίων πολυμεράσης.

5) Η σύνδεση του συμπλόκου ορμόνης-υποδοχέα επάγει κάποια μεταβολή στη δομή της χρωματίνης (απομακρύνοντας για παράδειγμα πυρηνικές πρωτεΐνες), η οποία μεταβιβάζεται στον υποκινητή, διευκολύνοντας έτσι το σχηματισμό συμπλόκου με την πολυμεράση (K. Ito, S. Yamamura, et al, 2006, Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-kB suppression).

Σχετικά με την αλλαγή της δομής της χρωματίνης, οι Reik et al. (1991) διαπίστωσαν μια αντιστρεπτή αλλαγή στην περιοχή του GRE η οποία διατηρείται μόνο παρουσία ορμόνης. Η αλλαγή αυτή φαίνεται να ισοδυναμεί με απομάκρυνση ή μετατόπιση δύο νουκλεοσωμάτων έτσι ώστε να αποκαλύπτονται οι θέσεις σύνδεσης άλλων παραγόντων. Ειδικότερα στην περίπτωση του LTR του MMTV υπάρχουν στοιχεία σύμφωνα με τα οποία η σύνδεση του υποδοχέα δίπλα στο νουκλεόσωμα κάνει προσπελάσιμη τη θέση σύνδεσης του NF1. Για το μηχανισμό αλλαγής της δομής της χρωματίνης προτείνεται συμμετοχή του υποδοχέα στην προσέλκυση παραγόντων SWI/SNF (Yoshinaga et al. 1992), οι οποίοι δρομολογούν συνεχείς κύκλους αποσταθεροποίησης του νουκλεοσώματος και ακόλουθη σύνδεση γειτονικών μεταγραφικών παραγόντων που συνεργάζονται (ακόμα και μετά την αποχώρηση του υποδοχέα) στην ενίσχυση της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων των γλυκοκορτικοειδών.

#### 1.14 ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ

Εκτός από την επαγωγή της έκφρασης γονιδίων-στόχων από τα γλυκοκορτικοειδή, υπάρχουν και περιπτώσεις αρνητικής ρύθμισης. Τέτοιες περιπτώσεις είναι αυτές των γονιδίων της α-υπομονάδας της ανθρώπινης γλυκοπρωτεΐνης, της προλακτίνης, της προοπιομελανοκορτίνης, της κολλαγενάσης, της προλιφερίνης κ.α. (Beato, 1989 και Saatcioglu et al., 1994).

Ένας τρόπος αρνητικής μεταγραφικής ρύθμισης είναι η μεταγραφική παρεμβολή του υποδοχέα στη δράση άλλων μεταγραφικών παραγόντων. Ο τρόπος αυτός περιλαμβάνει δύο τύπους παρεμβολής ανάλογα με το είδος του στοιχείου

απόκρισης που συμμετέχει στη διαδικασία. Μπορεί να πρόκειται για ένα απλό στοιχείο απόκρισης, όπως αυτό του γονιδίου της κολλαγενάσης, το οποίο ρυθμίζεται θετικά από τον AP-1 και αρνητικά από τα γλυκοκορτικοειδή. Ο μεταγραφικός παράγοντας AP-1 είναι ετεροδιμερές των προϊόντων των ογκογονιδίων c-fos και c-jun. Η θέση σύνδεσης του AP-1 στο γονίδιο της κολλαγενάσης δεν περιέχει θέση σύνδεσης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και η κατασταλτική δράση του υποδοχέα φαίνεται να εξασκείται μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Στην αλληλεπίδραση αυτή συμμετέχουν η περιοχή σύνδεσης στο DNA τόσο του υποδοχέα όσο και της πρωτεΐνης Jun καθώς και η περιοχή των αμινοξέων 40-111 της πρωτεΐνης Fos.

Η μεταγραφική παρεμβολή του υποδοχέα μπορεί να γίνει και μέσω ενός σύνθετου στοιχείου απόκρισης. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση της ρύθμισης της έκφρασης του γονιδίου της προλιφερίνης, η οποία μπορεί να ενεργοποιηθεί, να κατασταλεί ή να μείνει ανεπηρέαστη από τα γλυκοκορτικοειδή ανάλογα με τα επίπεδα των πρωτεϊνών Jun και Fos. Συγκεκριμένα, αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης προκαλεί καταστολή ενώ αύξηση των επιπέδων της Jun, επαγωγή. Στην πρώτη περίπτωση ο υποδοχέας αλληλεπιδρά με το συνδεδεμένο στο DNA, σύμπλοκο Jun/Fos, παρεμποδίζοντας τη δράση του στην ενεργοποίηση της μεταγραφής ενώ η δεύτερη, σχηματίζει μεταγραφικά ενεργό με την πρωτεΐνη Jun, η οποία είναι συνδεδεμένη στο DNA, ενισχύοντας τη δράση της στην ενεργοποίηση της μεταγραφής. Όλες οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις συμβαίνουν παράλληλα με τη σύνδεση των διαφόρων παραγόντων σε ένα σύνθετο στοιχείο απόκρισης στο DNA.

Ένας άλλος τρόπος αρνητικής ρύθμισης, είναι η άμεση ορμονο-εξαρτώμενη καταστολή της μεταγραφής, με σύνδεση του υποδοχέα σε ειδικές «αρνητικές» αλληλουχίες του DNA (negative GREs, n-GREs), με αποτέλεσμα τη μείωση της ενεργότητας της βασικής μεταγραφικής μηχανής χωρίς τη συμμετοχή άλλων μεταγραφικών παραγόντων. Με τον τρόπο αυτό καταστέλλεται η έκφραση των γονιδίων-στόχων, όπως το γονίδιο της προοπιομελανοκορτίνης. Υπάρχουν ενδείξεις για τη σύνδεση του υποδοχέα στα n-GREs με τη μορφή τριμερούς, αλλά ο τρόπος καταστολής της μεταγραφής δεν είναι γνωστός. Σύμφωνα με το Beato (1989), το n-GRE διατηρεί αμετάβλητες τις θέσεις: αδερίνη 4, κυτοσίνη 5, θυμίνη 10, γουανίνη 11 και κυτοσίνη 14, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη σύνδεση του υποδοχέα, ενώ η θυμίνη 12, υπεύθυνη για την ειδικότητα της σύνδεσης, έχει αντικατασταθεί από αδερίνη. Όταν ένα τέτοιο GRE αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα, αλλάζει η διαμόρφωσή του, με αποτέλεσμα τη μεταγραφική καταστολή (Beato, M, Gene regulation by steroid hormones).

## 2. ΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ ΩΣ ΠΡΩΤΟΓΕΝΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗ ΔΡΑΣΗΣ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ

### 2.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ: ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Το γενετικό υλικό σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο, δεν εντοπίζεται αποκλειστικά στον πυρήνα. Τα αμέσως μετά πιο σημαντικά υποκυτταρικά οργανίδια είναι τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες αφού περιέχουν το δικό τους DNA, απαραίτητο για τη λειτουργία τους.

Σύμφωνα με τη συμβιωτική θεωρία της εξέλιξης, τα οργανίδια αυτά, τα οποία είναι παραγωγοί ενέργειας στα ευκαρυωτικά κύτταρα, προέρχονται ευθέως από προκαρυωτικούς οργανισμούς, οι οποίοι ενσωματώθηκαν από πρωτόγονα ευκαρυωτικά κύτταρα νωρίς στην εξελικτική ιστορία και ανέπτυξαν συμβιωτική σχέση με αυτά. Με τη θεωρία αυτή δικαιολογείται η ύπαρξη του μιτοχονδριακού DNA. Βέβαια, με την πάροδο του χρόνου αφότου εμφανίστηκαν τα πρώτα ευκαρυωτικά κύτταρα, χάθηκε ένα μεγάλο μέρος του γονιδιώματος των μιτοχονδρίων με αποτέλεσμα να εξαρτώνται από διάφορες πυρηνικές πρωτεΐνες, οι οποίες συντίθενται στο κυτταρόπλασμα και στη συνέχεια μεταφέρονται στα μιτοχόνδρια. Το «κύτταρο-ξενιστής» εξαρτάται και αυτό από τα μιτοχόνδρια, για την παροχή ATP, απαραίτητο για τη διεξαγωγή των διάφορων λειτουργιών του όπως τη βιοσύνθεση, την άντληση ιόντων και την κίνηση.

Χαρακτηριστικό των μιτοχονδρίων είναι το ζεύγος μεμβρανών από τις οποίες οριοθετείται, η εξωτερική και εσωτερική μεμβράνη, οι οποίες είναι πολύ σημαντικές στις δραστηριότητές του και περιέχουν μια μοναδική συλλογή πρωτεϊνών. Η ύπαρξη των δύο μεμβρανών χωρίζει τα μιτοχόνδρια σε δύο ξεχωριστά διαμερίσματα: τη μήτρα και το διαμεμβρανικό χώρο.

Αναφορικά με τα χαρακτηριστικά των μεμβρανών, η εξωτερική μεμβράνη, είναι πλούσια σε πρωτεΐνες οι οποίες σχηματίζουν πόρους κατά μήκος της, με αποτέλεσμα να είναι διαπερατή σε μόρια μικρότερα από 10kDa. Επίσης, περιέχει ένζυμα, τα οποία μετατρέπουν λιπόφιλα υποστρώματα σε μορφές, οι οποίες ακολούθως μεταβολίζονται στη μήτρα. Η εσωτερική μεμβράνη έχει την εξής ιδιαιτερότητα: χαρακτηρίζεται από το μεγάλο αριθμό εγκολπώσεων που σχηματίζει λόγω των πολλών αναδιπλώσεων, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η επιφάνειά της. Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται αγκυροβολημένες στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη είναι πολύ σημαντικές γιατί είναι αυτές που φέρουν σε πέρας τις οξειδωτικές αντιδράσεις της αναπνευστικής αλυσίδας, καθώς και η ATP συνθετάση, υπεύθυνο ένζυμο για την παραγωγή ATP στη μήτρα και πρωτεΐνες μεταφοράς των διάφορων μεταβολιτών εντός και εκτός της μήτρας. Η ηλεκτροχημική βαθμίδωση



κατά μήκος της μεμβράνης αυτής, παραμένει σταθερή λόγω της αδιαπερατότητάς της σε μικρά ιόντα.

Στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων επιτελούνται κύριες μεταβολικές αντιδράσεις όπως η β-οξειδωση λιπαρών οξέων, ο κύκλος του κιτρικού οξέος και οι αντιδράσεις της αναπνευστικής αλυσίδας, ενώ η γλυκόλυση, η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων και το μεγαλύτερο μέρος του μεταβολισμού των αμινοξέων επιτελούνται στο διαλυτό κυτταρόπλασμα. Οι μεταβολίτες που χρησιμοποιούνται για τη β-οξειδωση, τον κύκλο του κιτρικού οξέος, αλλά και το υδρογόνο για την αναγωγή του NAD κατά τη γλυκόλυση, στην αναπνευστική αλυσίδα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, εισάγονται στο μιτοχόνδριο από το εξωτερικό περιβάλλον, ενώ αντίστροφα οι μεταβολίτες που παράγονται στα μιτοχόνδρια εξέρχονται για περαιτέρω επεξεργασία στο κυτταρόπλασμα.

Η εσωτερική επιφάνεια της εσωτερικής μεμβράνης φέρει τα οργανωμένα στοιχεία της αναπνευστικής αλυσίδας, την ηλεκτρική αφυδρογονάση και τους παράγοντες σύζευξης. Επιπλέον, η εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη παρουσιάζει υψηλή εκλεκτικότητα ως προς τη διαπερατότητά της σε διάφορες ενώσεις. Για το λόγο αυτό διαθέτει ειδικούς πρωτεϊνικούς φορείς οι οποίοι διακινούν διάφορους μεταβολίτες και νουκλεοτίδια στο εσωτερικό και στο εξωτερικό περιβάλλον του μιτοχονδρίου. Η διάβαση ουσιών από το ένα διαμέρισμα στο άλλο γίνεται μέσω συστημάτων, που μεταφέρουν ουσίες προς μια κατεύθυνση ή μέσω αμοιβαίας ανταλλαγής. Έτσι επιτυγχάνεται ο συντονισμός των μεταβολικών οδών ανάμεσα στο κυτταρόπλασμα και το μιτοχόνδριο.

Τα ένζυμα για την οξείδωση του πυροσταφυλικού οξέος, των λιπαρών οξέων αλλά και αυτά που συμμετέχουν στον κύκλο του κιτρικού οξέος (εκτός από την ηλεκτρική αφυδρογονάση) περιέχονται στη μήτρα του μιτοχονδρίου. Η μιτοχονδριακή μήτρα περιέχει και άλλα εκατοντάδες ένζυμα αλλά και πολλά αντίγραφα του γονιδιώματος του μιτοχονδριακού DNA, μιτοχονδριακά ριβοσώματα και tRNAs.

Τα μιτοχονδριακά γονίδια εκφράζουν πρωτεΐνες οι οποίες παίζουν κυρίως κεντρικό ρόλο στο συντονισμό των αντιδράσεων για παραγωγή ATP. Για παράδειγμα, στην οξειδωτική φωσφορυλίωση συμμετέχουν πέντε ενζυμικά σύμπλοκα αποτελούμενα από πολυπεπτίδια των οποίων οι υπομονάδες κωδικοποιούνται είτε από πυρηνικό DNA είτε και από πυρηνικό και μιτοχονδριακό DNA. Πρόκειται για τα εξής σύμπλοκα: το σύμπλοκο I (Οξειδοαναγωγή NADH-ουβικινόνη), το σύμπλοκο II (Ηλεκτρική αφυδρογονάση ουβικινόνη), το σύμπλοκο III (Οξειδοαναγωγή ουβι-υδροκινόνης –κυτοχρώματος c), το σύμπλοκο IV (Οξειδάση του κυτοχρώματος c) και το σύμπλοκο V (ATP συνθετάση). Τα πολυπεπτίδια αυτά κωδικούνονται από 50 πυρηνικά γονίδια και 13 μιτοχονδριακά γονίδια.

Συγκεκριμένα, η οξειδάση του κυτοχρώματος c των θηλαστικών αποτελείται από 13 πολυπεπτίδια εκ των οποίων οι τρεις υπομονάδες (υπομονάδες I, II και III) κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό DNA. Οι κωδικοευμένες από τον πυρήνα υπομονάδες αποτελούν κυρίως δομικά και όχι τόσο λειτουργικά στοιχεία του συμπλέγματος, ενώ μερικές από αυτές αλληλεπιδρούν ευθέως με τις κωδικοευμένες από το μιτοχόνδριο υπομονάδες. Η διαδικασία του συντονισμού των κωδικοευμένων από το μιτοχονδριακό DNA υπομονάδων, με τις κωδικοευμένες από το πυρηνικό DNA, γίνεται με σταδιακή αλληλεπίδραση των υπομονάδων αυτών με άλλες πρωτεΐνες, που δε συμμετέχουν στο τελικό λειτουργικό ενζυμικό σύμπλοκο.

## 2.2 ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΚΑΙ ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ

Η κατανομή και ο αριθμός των μιτοχονδρίων διαφέρει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων τύπων κυττάρων. Σε πολλά κύτταρα τα μιτοχόνδρια είναι τυχαία κατανεμημένα μέσα στο κυτταρόπλασμα, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις συγκεντρώνονται σε συγκεκριμένες περιοχές. Σε κάποια κύτταρα τα μιτοχόνδρια παραμένουν καθηλωμένα σε μια περιοχή του κυττάρου, έτσι ώστε να διοχετεύουν άμεσα το παραγόμενο ATP εκεί που απαιτείται ιδιαίτερα αυξημένη κατανάλωση ATP. Για παράδειγμα, σε ένα μυοκαρδιακό κύτταρο τα μιτοχόνδρια εντοπίζονται κοντά στη συσταλτική συσκευή, ενώ σε ένα σπερματοζώαριο συσσωρεύονται γύρω από το κινητό μαστίγιο. Είναι προφανές ότι η κατανομή των μιτοχονδρίων υποκυτταρικά σχετίζεται άμεσα με τη βασική λειτουργία τους ως κέντρων παραγωγής ενέργειας. Κατά τη μίτωση, τα μιτοχόνδρια συγκεντρώνονται κοντά στη μιτωτική άτρακτο και στο τέλος της κυτταρικής διαίρεσης κατανέμονται σχεδόν εξίσου στα θυγατρικά κύτταρα.

Ο αριθμός των μιτοχονδρίων σε κύτταρα διαφορετικού είδους ποικίλλει σημαντικά και μπορεί να μεταβάλλεται ανάλογα με τις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου. Τα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν μερικές εκατοντάδες μιτοχόνδρια, αν και ορισμένα ζωομαστιγοφόρα και φύκη έχουν μόνο ένα μιτοχόνδριο, το οποίο διαιρείται ταυτόχρονα με την κυτταρική διαίρεση. Στα κύτταρα των γραμμωτών μυών, ο αριθμός μπορεί να αυξηθεί κατά 5-10 φορές, λόγω της αύξησης και διαίρεσης των μιτοχονδρίων που συμβαίνει, όταν ο μυς διεγερθεί επαναληπτικά. Σε ορισμένα κύτταρα, τα μιτοχόνδρια αφθονούν ιδιαίτερα (π.χ. κάθε ηπατοκύτταρο περιέχει 1.000-2.000 μιτοχόνδρια), οπότε μπορούν να συγκροτήσουν μακρόστενες συστοιχίες μαζί με τους μικροσωληνίσκους του κυτταροσκελετού.

Στα καρκινικά κύτταρα, ο αριθμός των μιτοχονδρίων ελαττώνεται σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα, πιθανότατα λόγω μείωσης της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης

και αύξησης της γλυκολυτικής δράσης των κυττάρων (αποτέλεσμα Warburg) (Warburg, 1956).

Γενικώς, κύτταρα που έχουν υψηλές απαιτήσεις σε χημική ενέργεια (μυϊκά, νευρικά και καρδιακά) περιέχουν και πάρα πολλά μιτόχονδρια. Ενώ κύτταρα με μικρότερες ενεργειακές απαιτήσεις περιέχουν και μικρότερο αριθμό μιτοχονδρίων (Stryer, 1997; Alberts et al., 1998; Alberts et al., 2001; Γεωργάτσος, 2001).

### 2.3 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ

Εξελικτικά, το μιτοχονδριακό γονιδίωμα διαφοροποιήθηκε από το πυρηνικό, λόγω του περιορισμού του μιτοχονδριακού γενετικού συστήματος σε ιδιαίτερο περιβάλλον. Η εξελικτική ιδιομορφία του μιτοχονδριακού γενετικού κώδικα στα θηλαστικά φαίνεται στα ασυνήθιστα χαρακτηριστικά του όπως για παράδειγμα το κωδικόνιο UGA, δεν αποτελεί κωδικόνιο τερματισμού, αλλά διαβάζεται ως τρυπτοφάνη. Επίσης, το κωδικόνιο AUA δεν αντιστοιχεί σε μεθειονίνη αλλά σε ισολευκίνη. Τα κωδικόνια τερματισμού στο mtDNA αντιστοιχούν στα AGA και AGG, ενώ στο γενικό κώδικα διαβάζονται ως αργινίνη.

Οι διαφορές των δύο γονιδιωμάτων δεν περιορίζονται μόνο στη διαφορετική αντιστοίχιση των κωδικονίων με τα αμινοξέα αλλά και στο μέγεθος. Το μιτοχονδριακό DNA έχει σχετικά χαμηλό αριθμό γονιδίων που εκφράζουν tRNAs (22 γονίδια).

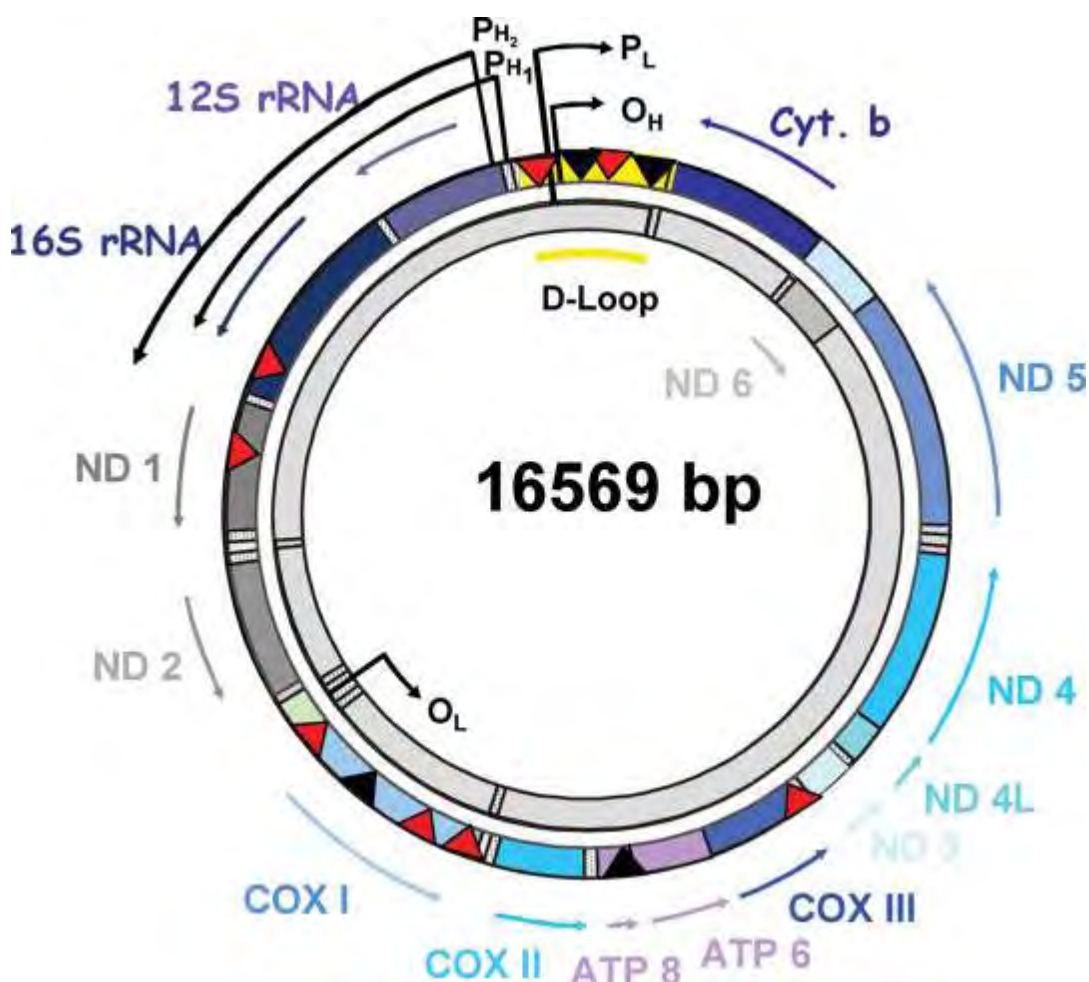
Το μιτοχονδριακό DNA βρίσκεται πακεταρισμένο σε κυκλική μορφή στα εκατοντάδες μιτοχόνδρια ενός κοινού ευκαρυωτικού κυττάρου. Σε αντίθεση με το πυρηνικό DNA, στο μιτοχονδριακό DNA δεν συνδέονται ιστόνες και η δομή του γονιδιώματος μοιάζει περισσότερο με αυτή των βακτηρίων, παρά με την ευκαρυωτική χρωματίνη. Το mtDNA έχει κανονικά την ικανότητα αντιγραφής και έκφρασης αλλά μόνο εντός των ορίων του μιτοχονδρίου και εκφράζει τα απαραίτητα tRNAs και rRNAs, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται το μιτοχονδριακό σύστημα μετάφρασης των γονιδίων σε πολυπεπτίδια.

Συγκεκριμένα, στα θηλαστικά, το μιτοχονδριακό DNA είναι ένα κλειστό κυκλικό δίκλωνο μόριο, μεγέθους περίπου 16kb προσκολλημένο στο εσωτερικό της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και περιέχει δύο διαφορετικές αλυσίδες, τη βαριά (H) και την ελαφριά (L). Τα ιντρόνια απουσιάζουν από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, μιας και αποτελείται εξ ολοκλήρου από κωδικεύουσες αλληλουχίες. Κωδικοποιεί 13 πρωτεΐνες, που αποτελούν όλες υπομονάδες ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας, δύο γονίδια αντιστοιχούν σε rRNAs και 22 γονίδια εκφράζουν tRNAs. Τα δύο rRNA και τα 14 tRNA κωδικοποιούνται από τη βαριά

αλυσίδα (H), καθώς και οι 12 από τις 13 πρωτεΐνες, ενώ 8 tRNA γονίδια και ένα για την πρωτεΐνη (υπομονάδα της NADH αφυδρογονάσης), εντοπίζονται στην ελαφριά (L).

Η αντιγραφή στα μιτοχόνδρια έχει ως σημείο έναρξης στη βαριά αλυσίδα (H), με τη βοήθεια ενός RNA πρόδρομου μορίου, το οποίο κωδικοποιείται από τον υποκινητή της ελαφριάς (L). Στην αντιγραφή, όπως και στη μεταγραφή, συμμετέχουν ένζυμα που εκφράζονται από το πυρηνικό DNA και συντίθενται στο κυτταρόπλασμα (όλα τα mRNAs του μιτοχονδρίου είναι ενδογενή).

In Silico ανάλυση (ανάλυση με χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή) αποκάλυψε την ύπαρξη στο μιτοχονδριακό DNA αλληλουχίες οι οποίες μπορούν να αποτελέσουν εν δυνάμει ορμονοανταποκρινόμενες αλληλουχίες τόσο για τους υποδοχείς στεροειδών όσο και για τους υποδοχείς θυρεοειδών ορμονών (Sekeris IN vivo 1999)



Εικόνα 2.1. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα και οι περιοχές με HREs. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα των θηλαστικών είναι κυκλικό, δίκλωνο μόριο, το οποίο αποτελείται από τη βαριά (H) και ελαφριά (L) αλυσίδα. Η L αλυσίδα μεταγράφεται από τον υποκινητή (PL) και η H αλυσίδα από τα παρακείμενα (PH1, PH2). Όλοι οι υποκινητές

εντοπίζονται στη ρυθμιστική περιοχή, τον D-βρόγχο. Η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων περιορίζεται στον D-βρόγχο, παρά την παρουσία εν δυνάμει μοριακές ρυθμιστικές αλληλουχίες (π.χ HREs) προσφέρουν την ικανότητα ρύθμισης και άλλων σταδίων της μεταγραφικής διαδικασίας. Η μεταγραφή από τους PH2 και PL παράγει μακριά, πολυκυστρονικά προϊόντα. Η μεταγραφή από το PH1 παράγει μικρά μηνύματα που περιέχουν δύο rRNAs. Ο ND6 και τα tRNAs για τα Gln, Ala, Asn, Cys, Tyr, Ser, Glu, και Pro παράγονται από τη μεταγραφή της ελαφριάς αλυσίδας, ενώ τα COXI, II, III, NAD1-5, κυτόχρωμα b, ATP-συνθετάση(ATP 6, 8), 12SRNA, 16SRNA, και τα υπόλοιπα tRNAs από το PH2. Η μεταγραφική μηχανή του μιτοχονδρίου μπορεί να φαίνεται απλή, σε σχέση με την πολυπλοκότητα της πυρηνικής μεταγραφής. Μια απλή πολυπεπτιδική, προκαρυωτικού τύπου DNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (POLRMT), η οποία παρουσιάζει υψηλή αλληλουχική ομοιότητα με το C-τελικό άκρο των T3/T7 πολυμερασών της οικογένειας των βακτηριοφάγων, είναι το μοναδικό ένζυμο σύνθεσης RNA στα μιτοχόνδρια. Για να αλληλεπιδράσει με στοιχεία υποκινητών, η POLRMT απαιτεί τη διαμεσολάβηση του μιτοχονδριακού μεταγραφικού παράγοντα A (TFAM) και ενός από τους δύο μεταγραφικούς παράγοντες B, TFB1M και TFB2M. Η POLRMT, ο TFAM, και ο TFB1M ή ο TFB2M επαρκούν για να καλύψουν τη μεταγραφή από έναν υποκινητή που περιέχει συγκεκριμένο τμήμα DNA. Επιπλέον, εκτός από αυτούς τους μεταγραφικούς παράγοντες που εμπλέκονται στα αρχικά στάδια της μεταγραφής, έχει απομονωθεί και άλλος ένας μεταγραφικός παράγοντας, ο MTERF. Ο MTERF προσδέεται σε μια αλληλουχία με συγκεκριμένο τρόπο στην περιοχή τερματισμού της μεταγραφής στο 30 άκρο του Leu-tRNA και στην περιοχή κοντά στην περιοχή έναρξης της μεταγραφής του PH1. Παίζει ρόλο στον τερματισμό του μεταγράφου H1 και στο μπλοκάρισμα της μεταγραφής της ελαφριάς αλυσίδας, αλλά διευκολύνει επίσης και την επανέναρξη της μεταγραφής του PH1. Ένας νέος μεταγραφικός παράγοντας, ο MTERF3, ο οποίος δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της μιτοχονδριακής μεταγραφής, έχει προστεθεί στη λίστα των μιτοχονδριακών μεταγραφικών παραγόντων.

Οι περιοχές στο γονιδίωμα που έχουν ταυτοποιηθεί πειραματικά για την πρόσδεση των υποδοχέων στεροειδών και θυροειδών ορμονών είναι:

Με κόκκινα τρίγωνα, HREs για υποδοχείς τάξης I (συναινετική αλληλουχία, AGAACAx<sub>xx</sub>TGTTCT)

Με μαύρα τρίγωνα, HREs για υποδοχείς τάξης I (συναινετική αλληλουχία, AGGTCAx<sub>xx</sub>TGACCT)

Μεταλλάξεις, όχι μόνο στα δομικά γονίδια αλλά και στις ρυθμιστικές περιοχές του γονιδιώματος (D-βρόγχος), μπορούν να συνδεθούν με διάφορες ασθένειες. (Από Psarra and Sekeris, (2008). Steroid and thyroid Hormone Receptors in Mitochondria. IUMBM Life 60, 210-223)

#### 2.4 ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ

Οι περισσότερες πληροφορίες στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα εντοπίζονται στη βαριά αλυσίδα, αν και οι δύο κλώνοι μεταγράφονται. Το γονιδίωμα αποτελεί μια πολυκιστρονική ομάδα και η μόνη μη κωδικεύουσα περιοχή του mtDNA, την περιοχή του D-βρόγχου (βρόγχος μετατόπισης) όπου εντοπίζονται οι υποκινητές. Η περιοχή αυτή περιέχει μια τριπλή DNA δομή και αποτελεί την περιοχή έναρξης της μεταγραφής.

Γενικά, η διαμόρφωση των μιτοχονδριακών γονιδιωματικών αλληλουχιών χαρακτηρίζεται από:

Α) Έλλειψη μεσογονιδιακών νουκλεοτιδικών διαστημάτων, τα οποία να μην κωδικοποιούνται. Συνεπώς, δεν είναι δυνατόν να υπάρχουν ρυθμιστικές περιοχές έκφρασης συγκεκριμένων γενετικών στοιχείων (εκτός και αν είναι ενδογονιδιακές).

Β) Ο D-βρόγχος αποτελεί τη μοναδική ρυθμιστική περιοχή με υποκινητές στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα.

Γ) Δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στον αριθμό, στον τύπο και την εντόπιση του μιτοχονδριακού DNA και των μιτοχονδριακών mRNAs.

Δ) Υπάρχουν μόνο δύο περιοχές του mtDNA των θηλαστικών οι οποίες δεν περιέχουν γονίδια. Η μια είναι η κοντή δυαδική αλληλουχία, η οποία λειτουργεί ως περιοχή έναρξης της αντιγραφής της ελαφριάς αλυσίδας και η δεύτερη είναι ο D-βρόγχος.

Ε) Στα περισσότερα θηλαστικά, οι D-βρόγχοι μεταγράφονται σε RNAs με πολύ μικρό χρόνο ημιζωής.

Η διαδικασία της μεταγραφής του mtDNA χαρακτηρίζεται από εξαιρετική συμμετρία για τους δύο κλώνους και ακολουθείται από εκτεταμένη μεταγραφική επεξεργασία. Η ελαφριά αλυσίδα μεταγράφεται με ρυθμό δύο με τρεις φορές μεγαλύτερο από τη βαριά, ενώ τα προϊόντα μεταγραφής της ελαφριάς έχουν μικρότερο χρόνο ημιζωής από αυτά της βαριάς, με αποτέλεσμα να μη συσσωρεύονται σε μεγάλο βαθμό στα μιτοχόνδρια.

Σχετικά με τη σύνθεση του RNA και τη μετα-μεταγραφική επεξεργασία, τα προϊόντα της ελαφριάς αλυσίδας συντίθενται πολύ πιο γρήγορα από αυτά στη βαριά αλυσίδα και η μεταγραφή της L-αλυσίδας γίνεται στο σύνολό της, χωρίς να υπάρχει λειτουργική αιτία γι' αυτό, αφού η έκφρασή του είναι περιορισμένη σε πολλές μικρές περιοχές κατανεμημένες στο 75% της συνολικής έκτασης του γονιδιώματος. Οι υποκινητές και στους δύο κλώνους βρίσκονται κοντά ο ένας στον άλλο, χωρίς επικαλύψεις, ενώ η έναρξη της μεταγραφής γίνεται ανεξάρτητα για κάθε κλώνο. Υπάρχουν δύο αλληλουχίες απαραίτητες για να είναι λειτουργικός ο υποκινητής: το

σημείο έναρξης της μεταγραφής και μια δεύτερη αλληλουχία αναρροϊκά του σημείου έναρξης της μεταγραφής και απαιτείται προκειμένου να επιτευχθεί υψηλό επίπεδο ειδικότητας της έναρξης. Οι αναρροϊκές αλληλουχίες στους δύο κλώνους είναι ανάστροφες η μια σε σχέση με την άλλη, με αποτέλεσμα οι ρυθμιστικοί παράγοντες της μιτοχονδριακής μεταγραφής δρουν και προς τις δύο κατευθύνσεις (Patricio Fernández-Silva, José A. Enriquez and Julio Montoya, 2003, Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA).

## 2.5 ΡΥΘΜΙΣΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ

Η γονιδιακή έκφραση στα μιτοχόνδρια δεν είναι αυτορυθμιζόμενη. Για τη μεταγραφή του mtDNA απαιτούνται, εκτός από τα πρωτεϊνικά συστατικά που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, πρωτεϊνικά συστατικά και μόρια RNA που κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια. Η μεταγραφική μηχανή των μιτοχονδρίων περιλαμβάνει κωδικευμένα στον πυρήνα ένζυμα και πρωτεΐνες, όπως η RNA πολυμεράση. Επίσης, πολλές από τις αντιδράσεις επεξεργασίας καταλύονται από ένζυμα μεταφερόμενα από το κυτταρόπλασμα.

Στον άνθρωπο, για την έναρξη της μιτοχονδριακής μεταγραφής, απαιτείται ο πρωτεϊνικός παράγοντας h-TFAM. Ο h-TFAM έχει μοριακό βάρος 25.000 Daltons και είναι απαραίτητος για ακριβή και αποτελεσματική αναγνώριση του υποκινητή, από τη μιτοχονδριακή RNA πολυμεράση των θηλαστικών. Ο μεταγραφικός αυτός παράγοντας έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά ειδικά με τις αναρροϊκές περιοχές του υποκινητών της βαριάς και της ελαφριάς αλυσίδας. Επιπλέον, έχει την ικανότητα να αναδιπλώνει, να κάμπτεται και να περιτυλίσσει μόρια DNA, σε συνεργασία με την τοποϊσομεράση I.

Η μιτοχονδριακή RNA πολυμεράση αποτελείται από ένα μόριο πολυμεράσης, μεγέθους 150kDa και από έναν επιπλέον παράγοντα, που απαιτείται για τον καθορισμό της ειδικότητας της έναρξης της μεταγραφής. Για την έναρξη της μεταγραφής, απαιτείται ειδική γεωμετρική διαμόρφωση του DNA, στην περιοχή των υποκινητών.

Αναφορικά με τον τερματισμό της μιτοχονδριακής μεταγραφής, έχει εντοπιστεί ο παράγοντας τερματισμού MTERF. Συγκεκριμένα, ο παράγοντας αυτός, προστατεύει μια περιοχή 25bp (γειτονική καταρροϊκά του 3' άκρου του γονιδίου που κωδικοποιεί το 16S rRNA), αλληλεπιδρά άμεσα με την πολυμεράση και επάγει μια δομική μεταβολή του ενζύμου αυτού, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του προϊόντος μεταγραφής.

### 3. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΙ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

#### 3.1 ΓΕΝΙΚΑ

Mouse models of proteins involved in mitochondrial DNA expression.

Gene	Mitochondrial function	Genetic manipulation	Mitochondrial DNA expression phenotype
<i>Tfam</i>	Transcription initiation/regulation Replication mtDNA maintenance	Knockout in: Whole body Heart/skeletal muscle, pancreatic $\beta$ cells, CNS Transgenic expression of human TFAM in a control background  Transgenic expression of human TFAM in <i>Tfam</i> knockout mice specific for the heart	Embryonic lethal/heterozygous $\downarrow$ mtDNA $\downarrow$ mtDNA/ $\downarrow$ transcripts/ $\downarrow$ proteins Normal mtDNA levels $\uparrow$ L-transcripts Normal levels H-transcripts Normal mtDNA levels $\downarrow$ Transcripts
<i>Tfb1m</i>	Translation regulator	Knockout in: Whole body Heart/skeletal muscle	Embryonic lethal Impaired translation Normal levels most mRNA $\downarrow$ 12S rRNA $\uparrow$ 16S rRNA $\uparrow$ ND1 $\uparrow$ tRNA
<i>Mterf2</i>	Positive transcription regulator	Knockout in: Whole body/viable	$\downarrow$ Most transcript and tRNAs imbalance $\downarrow$ Protein levels
<i>Mterf3</i>	Negative transcription regulator	Knockout in: Whole body Heart/skeletal muscle	Embryonic lethal $\uparrow$ Most transcript and tRNAs imbalance $\downarrow$ Protein levels
<i>Mterf4</i>	Translation regulator	Knockout in: Whole body Heart/skeletal muscle	Embryonic lethal Impaired translation $\uparrow$ most transcript and tRNAs imbalance transcribed from LSP
<i>Lrpprc</i>	mRNA stabilization	Knockout in: Whole body	Embryonic lethal

*Πίνακας 1. Παρουσιάζει τα μοντέλα πρωτεϊνών, στον ποντικό, που εμπλέκονται στην έκφραση του μιτοχονδριακού DNA. Παρουσιάζονται τα γονίδια, οι μιτοχονδριακές λειτουργίες των αντίστοιχων πρωτεϊνών και οι γενετικοί χειρισμοί για το κάθε ένα από αυτά. (Από Susana Peralta, Xiao Wang, Carlos T. Moraes (2011). Mitochondrial transcription: Lessons from mouse models)*

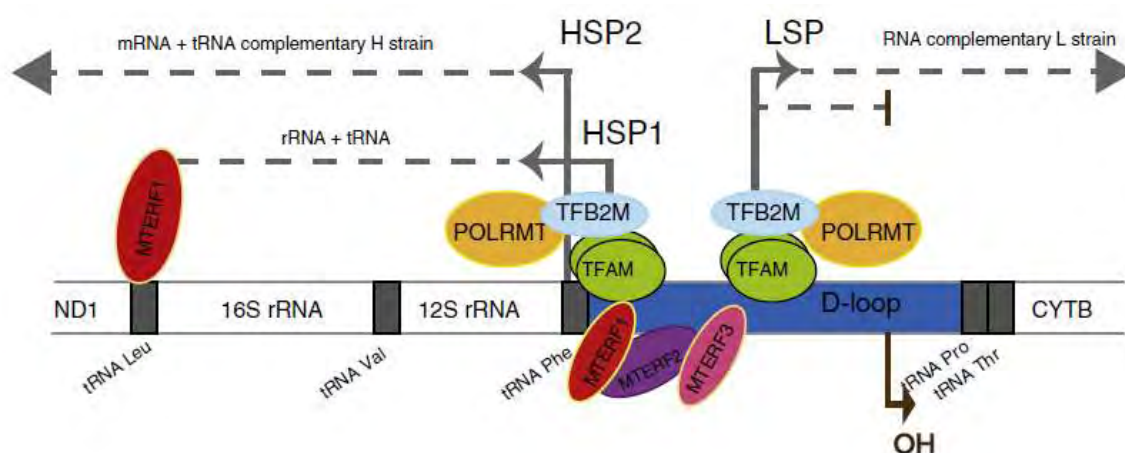
Υπάρχουν δύο μη-κωδικές περιοχές (NCR) στο mtDNA οι οποίες ρυθμίζουν τη μεταγραφή και την αντιγραφή του. Η κύρια ρυθμιστική περιοχή μήκους 900bp, είναι γνωστή ως D-βρόγχος, περιέχει το μεταγραφικό υποκινητή των δύο αλυσίδων και την περιοχή έναρξης της αντιγραφής στη βαριά αλυσίδα. Επιπλέον, πολλές μελέτες έχουν καταδείξει το συσχετισμό πολλαπλών πρωτεϊνών με την περιοχή του D-βρόγχου, καθορίζοντας ότι η περιοχή αυτή είναι ο κύριος μεταγραφικός ρυθμιστής. Η μικρότερη περιοχή NCR, που βρίσκεται μεταξύ των κωδικών περιοχών tRNACys και tRNAAsn είναι σχετικά μικρή (30bp) και περιέχει την περιοχή έναρξης της αντιγραφής στην ελαφριά αλυσίδα. Το mtDNA μεταγράφεται ως πολυκυστρονικές μεταγραφικές μονάδες, οι οποίες ακολούθως επεξεργάζονται για να δώσουν tRNAs, rRNAs και mRNAs.

Έχουν ταυτοποιηθεί δύο περιοχές στον υποκινητή της μιτοχονδριακής μεταγραφής, η HSP1 και η HSP2, οι οποίες βρίσκονται στη βαριά αλυσίδα. Η ύπαρξη της HSP2 αποτέλεσα αντικείμενο συζητήσεων μιας και δεν παρατηρείται εύκολα σε in vitro



αναλύσεις. Οι υποκινητές HSP1 και HSP2, όπως έχει διαπιστωθεί με δοκιμή προστασίας από την S1 νουκλεάση, είναι τοποθετημένοι ο ένας πολύ κοντά στον άλλο, με απόσταση περίπου 100bp, και μεταγράφονται από την ίδια κατεύθυνση.

Ο τερματισμός των μεταγράφων που κινείται από τον υποκινητή HSP2 έχει μελετηθεί σε λιγότερο βαθμό, αλλά η περιοχή πλούσια σε A/T, η H2, εντοπίζεται αναρροϊκά του γονιδίου για το tRNAPhe και έχει προταθεί για την περιοχή τερματισμού της μεταγραφής. Πρόσφατα ορισμένες πρωτεΐνες έχουν ταυτοποιηθεί για την πρόσδεση στο mtDNA ποντικού στην H2 περιοχή τερματισμού, συμπεριλαμβανομένου της ATAD3 και της πρωτεΐνης πλούσιας σε λευκίνη, που περιέχει πεντατρικοπεπτιδικές επαναλήψεις (LRPPRC).



Εικόνα 3.1. Μοντέλο της μιτοχονδριακής μεταγραφικής μηχανής και των υποκινητών της.

Η μιτοχονδριακή μεταγραφή είναι δύο κατευθύνσεων και ξεκινά στην περιοχή του D-βρόγχου, όπου βρίσκονται οι υποκινητές HSP1, HSP2 και LSP. Η μεταγραφική επαγωγή απαιτεί τη συνεργασία του TFAM, του TFB2M και της RNA πολυμεράσης POLRMT. Ο TFAM προσδένεται στο mtDNA αναρροϊκά των υποκινητών. Η μεταγραφή που υποκινείται από τον HSP1 τερματίζεται στο tRNA<sub>Leu</sub>(UUR), μεταγράφοντας μόνο το tRNA<sub>Val</sub>, το tRNA<sub>Phe</sub> και τα 2 rRNAs. Ωστόσο, η μεταγραφή που επάγεται από τον υποκινητή HSP2 παράγει μετάγραφο για όλο το mtDNA από τη βαριά αλυσίδα. Τα μέλη της οικογένειας MTERF, οι MTERF1, MTERF2 και MTERF3, προσδένεται στην περιοχή του υποκινητή και ρυθμίζουν τη μεταγραφή του mtDNA. Ο MTERF1 προσδένεται επίσης στο tRNA<sub>Leu</sub>(UUR) επάγει τον τερματισμό της μεταγραφής. Τα μετάγραφα που παράγονται από τον υποκινητή LSP προέρχονται από ολόκληρο το μόριο του mtDNA ή μπορεί να τερματίζονται πρόωρα για την αντιγραφή του mtDNA. Το OH προσδιορίζει την περιοχή έναρξης της αντιγραφής. (Από Susana Peralta, Xiao Wang, Carlos T. Moraes (2011). *Mitochondrial transcription: Lessons from mouse models*)

### 3.2 TFAM

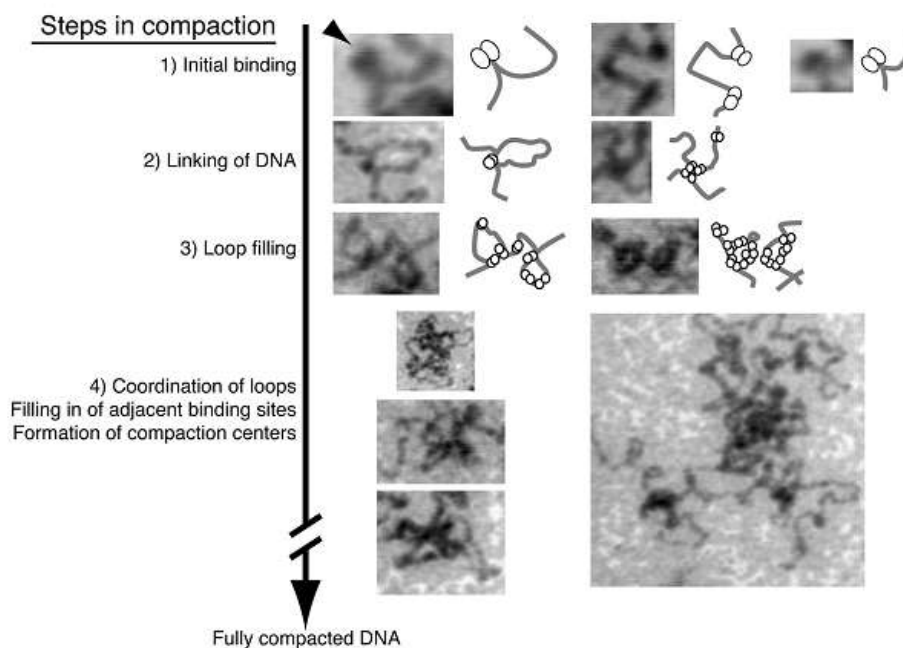
Ο ανθρώπινος μεταγραφικός παράγοντας που δρα σε συνεργασία καθαρά με τη μιτοχονδριακή RNA πολυμεράση έχει απομονωθεί, το cDNA του έχει κλωνοποιηθεί και αλληλουχιθεί και το γονίδιό του έχει χαρακτηριστεί. Ο παράγοντας αυτός, είναι ο TFAM, είναι μια άφθονη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη των 25kDa και αποτελείται από δύο υψηλής κινητικότητας ομαδοποιημένες (HMG) επικράτειες, διαχωρισμένες από ένα συνδέτη 27 αμινοξικών καταλοίπων, ο οποίος ακολουθείται από 25 αμινοξικά κατάλοιπα της βασικής καρβοξυτελικής ουράς. Ο HMG επικράτειες θεωρούνται ότι εμπλέκονται στην πρόσδεση στο DNA και βρίσκονται σε μια οικογένεια πρωτεϊνών οι οποίες εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως η ενίσχυση της μεταγραφής και το πακετάρισμα της χρωματίνης. Η ανάλυση των μεταλλάξεων στον ανθρώπινο TFAM έχει καταδείξει ότι η καρβοξυτελική του ουρά είναι σημαντική για την ειδική DNA αναγνώριση και είναι ζωτική για την επαγωγή της μεταγραφής σε υψηλά επίπεδα (Dongchon Kang, Sang Ho Kim, Naotaka Hamasaki, 2007, Mitochondrial transcription factor A (TFAM): Roles in maintenance of mtDNA and cellular functions).

Με τη βοήθεια in vitro δοκιμασιών προστασίας με DNase 1 σε συνδυασμό με run-off μεταγραφικές δοκιμασίες, έχει παρατηρηθεί ότι η πρόσδεση του TFAM στις περιοχές αμέσως μετά (αναρροϊκά) του HSP ή του LSP ( $10^4$  bp αναρροϊκά από την κάθε περιοχή έναρξης), απαιτείται για να επαχθεί η μεταγραφή. Η πρόσδεση του TFAM στις περιοχές αυτές έχει υποστηριχθεί από πειράματα. Και οι δύο κύριοι υποκινητές της μεταγραφής στα ανθρώπινα μιτοχόνδρια μπορούν να λειτουργήσουν σε δύο κατευθύνσεις, και in vitro τόσο καλά όσο και in vivo. Για την αρχική πλευρά έναρξης προς μια κατεύθυνση ευθύνεται η πρόσδεση του TFAM ασυμμετρικά. Υπάρχει μια αυστηρή προϋπόθεση για ένα φυσικό κενό 10bp (μια α-έλικα) μεταξύ της περιοχής πρόσδεσης του TFAM και της περιοχής έναρξης της μεταγραφής. Ο μεταγραφικός παράγοντας έχει την ικανότητα να τυλίγει και να ξετυλίγει το DNA in vitro με ένα μη-ειδικό σύμπλεγμα πρωτεΐνης-DNA και η μικροσκοπία σάρωσης έχει πρόσφατα καταδείξει ότι ο ομόλογος παράγοντας στον *Xenopus* προκαλεί μια απότομη κάμψη της διπλής έλικας στην περιοχή ενεργοποίησης του υποκινητή. Αυτές οι μεταβολές του mtDNA που επάγονται από τον TFAM, απαιτούνται για να επιτραπεί η πρόσβαση της RNA πολυμεράσης για την επαγωγή της μεταγραφής. Η έλξη του TFAM για πρόσδεση στην περιοχή αναρροϊκά του LSP είναι αρκετά δυνατή και ο TFAM ενισχύει σημαντικά τη μεταγραφή της ελαφριάς αλυσίδας. Αντιθέτως, η τάση του για πρόσδεση στην περιοχή αναρροϊκά του HSP είναι πιο ασθενής και ο TFAM ρυθμίζει σε μέτριο βαθμό τη μεταγραφή της βαριάς αλυσίδας. Αυτό συνιστά ότι επιπλέον παράγοντες, οι οποίοι δεν μπορούν να χειριστούν in vitro, μπορεί να είναι απαραίτητοι για την αποτελεσματική επαγωγή της μεταγραφής στον HSP in vivo.

Σε διάφορες μελέτες έχει αναφερθεί και ένας άλλος σημαντικός βιολογικός ρόλος του TFAM, εκτός από την επαγωγή της μιτοχονδριακής μεταγραφής. Η άφθονη αυτή HMG πρωτεΐνη, προσδένεται στο DNA συνεργατικά με μικρομοριακή συγγένεια ως ομοδιμερές. Με τον τρόπο αυτό είναι κατάλληλος για το συντονισμό και τη συμπύκνωση ορισμένων μορίων DNA μαζί έτσι ώστε να σχηματίσουν σφαιροειδείς δομές. Ο ρόλος αυτός του TFAM θα μπορούσε να παρομοιαστεί με τον αντίστοιχο

ρόλο των ιστονών στον πυρήνα. Ο ανθρώπινος TFAM, καθώς και αυτός στον ποντικό που παρουσιάζει ομολογία κατά 78%, έχει βρεθεί ότι παρουσιάζει ποιοτικά υψηλή συγγένεια με μη-ειδικό DNA (Ekstrand *et al.*, 2004). Ο TFAM, με τη βοήθεια ανοσοχημείας, έχει εντοπιστεί σε νουκλεοτιδικούς σχηματισμούς. Η ακριβής λειτουργία του TFAM στα νουκλεοτίδια των θηλαστικών δεν είναι ξεκάθαρη. Κάποια στοιχεία καταδεικνύουν ότι το mtDNA καλύπτεται από τον παράγοντα, προτείνοντας ένα ρόλο στο πακετάρισμα (Alam *et al.*, 2003). Κάθε συμπύκνωση που προέρχεται από τη δέσμευση του TFAM, αποδίδεται από μια τυπική κάμψη του DNA από τις επικράτειες υψηλής κινητικότητας (HMG). Τα επίπεδα έκφρασης του TFAM και ο αριθμός των αντιγράφων του mtDNA παρουσιάζουν ισχυρή συσχέτιση. Αυτός είναι ένας ακόμα λόγος που πιθανολογείται ότι ο TFAM αποτελεί τη «σκαλωσιά» στην οποία βασίζεται ο σχηματισμός του νουκλεοτιδίου.

Η ανάπτυξη *in vitro* συστημάτων τα οποία προσομοιάζουν τα ειδικά και μη-ειδικά χαρακτηριστικά της πρόσδεσης TFAM-DNA, βοήθησε στη διευκρίνιση του ρόλου του TFAM στο νουκλεοτίδιο mtDNA, καθώς και στον καθορισμό του μηχανισμού σχηματισμού του. Αρχικά, ο TFAM προσδένεται, ως διμερές, στο γυμνό DNA και σε χαμηλή πληρότητα προκαλεί το σχηματισμό δομών βρόχου στο DNA (δομές Ω). Έπειτα, ο TFAM μπορεί να δεσμεύσει μια άλλη περιοχή DNA, στο ίδιο ή σε διαφορετικό μόριο DNA (*cis* ή *trans*). Επιπλέον μόρια TFAM προσδένονται στο εγγύ DNA, έτσι ώστε ο βρόγχος να αρχίζει να γεμίζει και οι παράγοντες να επεκτείνονται κατά μήκος του DNA. Οι γεμάτοι βρόγχοι συντονίζονται και οργανώνονται γύρω από μια κεντρική δομή, γύρω από την οποία και άλλες πρωτεΐνες αρχίζουν να προστίθενται. Στα τελικά στάδια, συχνά παρατηρούνται πολλαπλά μόρια DNA τα οποία συντονίζονται και συνδέονται σε ένα μοναδικό πλέγμα.



Εικόνα 3.2. Μοντέλο της συμπύκνωσης του mtDNA.

*Η διαδικασία της συμπύκνωσης αναπτύσσεται από την αρχική πρόσδεση σε ένα πλήρως συμπυκνωμένο DNA, με αρκετά στάδια ενδιάμεσης οργάνωσης.*

*(Από Brett A. Kaufman, Nela Durisic, Jeffrey M. Mativetsky, Santiago Costantino, Mark A. Hancock, Peter Grutter and Eric A. Shoubridge (2007). The Mitochondrial Transcription Factor TFAM Coordinates the Assembly of Multiple DNA Molecules into Nucleoid-like Structures. Molecular Biology of the Cell Vol. 18, 3225–3236, September 2007)*

### 3.3 TFB1M, TFB2M

Οι μιτοχονδριακοί μεταγραφικοί παράγοντες B1 (TFB1M) και B2 (TFB2M) είναι απαραίτητοι για τη βασική μεταγραφή του μιτοχονδριακού DNA. Οι δύο ισομορφές του h-mtTFB, οι TFB1M και TFB2M, εκφράζονται συνεχώς και ο κάθε ένας από αυτούς μπορεί να υποστηρίξει τη μεταγραφή του mtDNA σε ένα σύνθετο σύστημα, το οποίο περιλαμβάνει τη μιτοχονδριακή RNA πολυμεράση (POLRMT) και το μιτοχονδριακό παράγοντα A (TFAM), για την άμεση επαγωγή από τα HSP και LSP. Ο TFB1M αλληλεπιδρά με τον καρβοξυτελικό τομέα του TFAM και η περιοχή της επαφής των δύο αυτών παραγόντων είναι σημαντική για την ενεργοποίηση της μεταγραφής και αντιστοιχεί σε μια περιοχή 29 αμινοξέων (περιοχή ενεργοποίησης του TFAM).

Οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες αλληλεπιδρούν άμεσα με την POLRMT, αλλά ο TFB2M είναι τουλάχιστον μια τάξη μεγέθους πιο ενεργός στην προαγωγή της μεταγραφής από ότι ο TFB1M. Αρχικά, ο TFB1M είχε αναφερθεί ως ένας μιτοχονδριακός μεταγραφικός παράγοντας *in vitro*. Ωστόσο, μελέτες με conditional knockout μοντέλα ποντικού έδειξαν πως πρόκειται για μια rRNA μεθυλοτρανσφεράση απαραίτητη για τη μιτοχονδριακή μετάφραση *in vivo*. Όντως, οι παράγοντες αυτοί παρουσιάζουν εξαιρετική ομολογία με τις βακτηριακές rRNA διμεθυλοτρανσφεράσες, πράγμα που προτείνει ότι ένα ένζυμο, τροποποιητικό για το RNA, στρατολογήθηκε, κατά την εξέλιξη, ώστε να λειτουργεί ως μιτοχονδριακός μεταγραφικός παράγοντας. Η ύπαρξη δύο πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την POLRMT μπορεί να επιτρέπει την ευέλικτη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων του mtDNA, ως απάντηση στις φυσιολογικές απαιτήσεις του μεταβολισμού των θηλαστικών.

### 3.4 MTERF

Οι πρωτεΐνες MTERF έχουν εμπλακεί στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής, αντιγραφής και μετάφρασης. Όπως και οι υπόλοιπες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του mtDNA, οι πρωτεΐνες MTERF κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γονιδίωμα και ακολούθως μεταφέρονται στα μιτοχόνδρια. Έχουν ταυτοποιηθεί τέσσερα μέλη της οικογένειας αυτής στα σπονδυλωτά, οι MTERF 1-4. Από τους τέσσερις, οι MTERF1 και MTERF2 βρίσκονται αποκλειστικά στα

σπονδυλωτά, ενώ οι METRF3 και MTERF4 βρίσκονται στα σκουλήκια και στα έντομα, και εμφανίζονται ως τα αρχαιότερα γονίδια στα μετάζωα. Όλα τα μέλη της οικογένειας ακολουθούν ένα συντηρημένο METRF μοτίβο. Μια λεπτομερής ανάλυση της δομής και της λειτουργίας της *in vitro* συντιθέμενης MTERF1 πρωτεΐνης υποστηρίζει ότι το μοτίβο MTERF χαρακτηρίζεται από τομείς σαν φερμουάρ λευκίνης, που επιβεβαιώνουν την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA. Πρόσφατα, έχει επιλυθεί η κρυσταλλική δομή των πρωτεϊνών METRF1 και MTERF3 και προτάθηκε ότι το μοτίβο METRF περιλαμβάνει 3 τομείς α-έλικας, διαχωρίζεται από βρόγχους, σε πλήρη αντίφαση με το προηγούμενο μοντέλο με το φερμουάρ λευκίνης. Τα διάφορα METRF μοντέλα, τα οποία είναι συντηρημένα στην οικογένεια αυτή, σχηματίζουν ένα σαν «ντόνατ» σχηματισμό, με δεξιόστροφη υπερελίκωση, που μεσολαβεί για την αλληλεπίδραση με το DNA.

(Marina Roberti, et al, 2009, The MTERF family proteins: Mitochondrial transcription regulators and beyond).

Ο MTERF1, ο οποίος παραδοσιακά αναφέρεται ως MTERF, ήταν το πρώτο μέλος από την οικογένεια που ταυτοποιήθηκε ως μιτοχονδριακός μεταγραφικός παράγοντας τερματισμού στα ανθρώπινα μιτοχόνδρια. Η μεταγραφή που ξεκινά από τον υποκινητή HSP1, κωδικοποιεί τα the 2 rRNA, tRNA<sup>Val</sup> και tRNA<sup>Phe</sup>, και συνήθως τερματίζεται καταρροϊκά του 16S rRNA, πιθανόν από τη δράση της πρωτεΐνης MTERF1. Έχει αποδειχθεί ότι ο MTERF1 προσδένεται σε μια περιοχή 28bp στο 3' άκρο του γονιδίου tRNA<sup>Leu</sup>(UUR), καταρροϊκά του 16S rRNA, κοινώς γνωστή ως περιοχή μεταγραφικού τερματισμού (TERM). Η πρόσδεση του MTERF1 στην TERM περιοχή επιβεβαιώθηκε με τη χρήση *in vivo* πειράματα σε ανθρώπινα κύτταρα. Πρόσφατα, η συγκεκριμένη αναγνώριση της αλληλουχίας της περιοχής TERM, αποδόθηκε σε πέντε κατάλοιπα αργινίνης που διατηρούνται στις πρωτεΐνες MTERF1 ανάμεσα στα είδη, αλλά όχι στις υπόλοιπες πρωτεΐνες MTERF. Η μετάλλαξη A3243G στην περιοχή πρόσδεσης στον MTERF1 στο γονίδιο tRNA<sup>Leu</sup>(UUR), προκαλεί τη μιτοχονδριακή ασθένεια MELAS (μιτοχονδριακή εγκεφαλομυοπάθεια, γαλακτική οξείδωση και επεισόδια εγκεφαλικού). Η παρουσία της μετάλλαξης έδειξε ότι μειώνει την ικανότητα πρόσδεσης του MTERF1 *in vitro* αλλά όχι *in vivo*. Αν και η συγγένεια του MTERF1 στην περιοχή που φέρει τη μετάλλαξη A3243G είναι πολύ χαμηλότερη, δεν βρέθηκαν διαφορές στα επίπεδα των rRNA/mRNA μεταγράφων *in vitro*. Ωστόσο, χρειάζονται επιπλέον μελέτες για τον καθορισμό του ρόλου του MTERF1 στην ασθένεια MELAS.

Επιπλέον του ρόλου του MTERF1 στον τερματισμό της μεταγραφής, ο MTERF1 κατέδειξε ότι επάγει την έναρξη της μεταγραφής μέσω της πρόσδεσής του στην περιοχή του υποκινητή της μεταγραφής, κοντά στην περιοχή HSP1. Έχει προταθεί ένα μοντέλο όπου ο MTERF1 προσδένεται ταυτοχρόνως στην HSP1 και TRERM περιοχή, δημιουργώντας ένα βρόγχο στο mtDNA, ο οποίος προωθεί την ανακύκλωση της μεταγραφής. Με το μοντέλο αυτό μπορεί να εξηγηθούν τα υψηλότερα επίπεδα rRNA:mRNA στα κύτταρα. Η επαγόμενη από τον MTERF1 μεταγραφική ενεργοποίηση δεν μπορεί να αναπαρασταθεί *in vitro*, γεγονός που υποδηλώνει τη συμμετοχή και άλλων παραγόντων. Πρόσφατα, έχει αποδειχθεί ότι οι MTERF2 και MTERF3 προσδένονται στην περιοχή HSP, προτείνοντας έναν πιθανόν

ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφικής επαγωγής. Ένας επιπλέον ρόλος, εκτός από τη μεταγραφική επαγωγή και τερματισμό, ο MTERF1 εμπλέκεται στη ρύθμιση της αντιγραφής και συγκεκριμένα στην παύση της αντιγραφής.

Ο MTERF1 είναι ο πιο μελετημένος παράγοντας από τα μέλη της οικογένειας MTERF, αλλά πολύ λίγα είναι γνωστά για τη ρυθμιστική του λειτουργία *in vivo*. Έχουν γίνει μελέτες με MTERF2, 3 και 4 knockout ποντίκια, αλλά όχι με MTERF1. Τα knockout MTERF3 και MTERF4 ποντίκια είναι εμβρυϊκά θνησιγενή, υποδεικνύοντας ότι τα γονίδια αυτά είναι απαραίτητα για την επιβίωση των θηλαστικών. Αντιθέτως, ποντίκια με έλλειψη του γονιδίου MTERF2 είναι βιώσιμα και έχουν ήπιους φαινότυπους.

Ο MTERF3, ή αλλιώς MTERF.D1, ταυτοποιήθηκε ως μέλος της οικογένειας MTERF με τη χρήση συγκριτικών γενετικών αναλύσεων. Με μελέτες με knockout ποντικών, παρατηρήθηκε μικρότερη διάρκεια ζωής σκελετικό μυ και φαινότυπος καρδιομυοπάθειας. Επίσης, παρατηρήθηκε μείωση της δράσης των ενζύμων OXPHOS και των επιπέδων των πρωτεϊνών της αναπνευστικής αλυσίδας στην καρδιά. Με τη βοήθεια ανσοκατακρήμνισης χρωματίνης, έχει αποδειχθεί ότι ο MTERF3 προσδένεται στην περιοχή HSP του υποκινητή στο mtDNA, ρυθμίζοντας την έναρξη της μεταγραφής. Σύμφωνα με πειράματα *de novo* μεταγραφής σε απομονωμένα μιτοχόνδρια από MTERF3 knockout κύτταρα καρδιάς, η μεταγραφή αυξήθηκε κατά 50% και από τους δύο υποκινητές, τον HSP και LSP, σε σύγκριση με τα controls, προτείνοντας ότι ο MTERF3 είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής της μιτοχονδριακής μεταγραφής *in vivo* (C.B. Park, et al, 2007, MTERF3 is a negative regulator of mammalian mtDNA transcription).

Ο MTERF4, επίσης γνωστός ως MTERF.D2, ταυτοποιήθηκε μέσω φυλογενετικής ανάλυσης ως μέλος της οικογένειας MTERF, κωδικοποιώντας πρωτεΐνη με προβλέψιμο μιτοχονδριακό εντοπισμό. Σύμφωνα με τη στοίχιση αλληλουχιών, το MTERF4 βρίσκεται όχι μόνο στα σπονδυλωτά, αλλά και στα σκουλήκια και στα έντομα και είναι ένα προγονικό MTERF γονίδιο, παρόμοιο με το MTERF3. Η MTERF4 είναι μια πυρηνικά κωδικοποιούμενη πρωτεΐνη με μειωμένες γνώσεις για αυτή, λόγω ανεπάρκειας πειραμάτων λειτουργίας *in vitro*. Με τη βοήθεια φασματομετρία μάζας και με χρωματογραφική ανάλυση, καταδείχθηκε ότι ο MTERF4 αλληλεπιδρά με τη μιτοχονδριακή RNA μεθυλοτρανσφεράση NSUN4, σχηματίζοντας ένα ετροδιμερές. Το σύμπλεγμα MTERF4-NSUN4 βρέθηκε να συν-καθιζάνει μαζί με τη μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα σε δοκιμασίες καθίζησης κλίσης, ενώ η στόχευση της NSUN4 στη μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα μειώνεται κατά πολύ ή καταργείται στην απουσία του MTERF4, είτε *in vitro* είτε *in vivo*. Τα δεδομένα αυτά προτείνουν ότι ο MTERF4 ρυθμίζει τη μιτοχονδριακή γονιδιακή έκφραση μέσω της πρόσδεσης και της στόχευσης της NSUN4 στη μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα. Τα συστηματικά και ιστο-ειδικά MTERF4 knockout μοντέλα ποντικών έδειξαν τον καθοριστικό ρόλο του παράγοντα αυτού στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μετάφρασης. Στα μοντέλα αυτά, συστήνεται η αύξηση των επιπέδων του TFAM και του TFB2M, ως αντισταθμιστικός μηχανισμός για την σοβαρή έλλειψη στην αναπνευστική αλυσίδα. Δεν είναι βέβαια αποδεδειγμένο ότι ο MTERF4 δρα άμεσα σηματοδοτικά για να

καταστείλει τη διαδικασία αυτή. Τέλος, ο MTERF4 φέρει περιοχή πρόσδεσης στο DNA και δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα να προσδένεται στο mtDNA και να ρυθμίζει τη μεταγραφή.

#### **4. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ**

##### **4.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΣΤΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ**

Ο πυρηνικός και ο μιτοχονδριακός μεταβολισμός επηρεάζεται άμεσα από τα γλυκοκορτικοειδή. Έχει αποδειχθεί ότι τα μιτοχόνδρια έχουν την ικανότητα της ταχείας πρόσληψης της κορτιζόλης, με τη βοήθεια πειραμάτων επώασης μιτοχονδριακού ομογενοποιημάτος ήπατος αρουραίου με σημασμένη με  $^{14}\text{C}$  ορμόνη. Διαπιστώθηκε, επίσης, ότι οι ορμόνες συνδέονται με το μιτοχονδριακό κλάσμα περισσότερο, παρά με τα πυρηνικά υπερκείμενα. Η πρόσληψη σημασμένης κορτιζόλης από μιτοχόνδρια δείχθηκε και σε πειράματα υποκυτταρικής κατανομής και σε πειράματα ενδοφλέβιας χορήγησης, της οποίας εντοπίζεται σημαντική ποσότητα σε απομονωμένο μιτοχονδριακό κλάσμα, σε μη μεταβολισμένη μορφή.

Το γλυκοκορτικοειδή επηρεάζουν την οξειδωτική φωσφορυλίωση με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, είτε με βραχείας είτε με μακράς μορφής επιδράσεις. Με χρόνια χορήγηση γλυκοκορτικοειδών σε πειραματόζωα, παρατηρήθηκαν έντονες μεταβολές στον οξειδωτικό μεταβολισμό του ήπατος: μείωση των ρυθμών οξείδωσης των υποστρωμάτων, ελάττωση της δράσης της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης και της ικανότητας πρόσληψης και διατήρησης ασβεστίου στα κύτταρα.

Από την άλλη πλευρά, μικρής διάρκειας χορήγηση γλυκοκορτικοειδών σε αρουραίους, έχει ως αποτέλεσμα την αξιοποίηση υποστρωμάτων σε απομονωμένα ηπατικά μιτοχόνδρια. Αυτή η επαγωγή παρατηρήθηκε στην καρβοξυλίωση και τη αποκαρβοξυλίωση των πυροσταφυλικών και στην οξείδωση του β-υδροξυβουτυρικού και ηλεκτρικού κατά τη διάρκεια του σταδίου II της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Scheller, Seibel, Sekeris, 2003, Glucocorticoid and Thyroid Hormone Receptors in Mitochondria of Animal Cells).

Ένας από τους μηχανισμούς της επίδρασης των γλυκοκορτικοειδών στο μιτοχονδριακό μεταβολισμό, μπορεί να είναι η απευθείας ρυθμιστική δράσης τους στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα, ως trans acting παράγοντες.

Την υπόθεση της απευθείας δράσης των ορμονών στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα, ενισχύει η ύπαρξη HREs στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα, τα οποία εμφανίζουν ομοιότητα με τις συναινετικές δεκαπεντανουκλεοτιδικές παλίνδρομες αλληλουχίες. Όπως προαναφέρθηκε βρέθηκαν οκτώ GREs στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα του ποντικού, που εμφανίζουν διαφορετικό βαθμό ομοιότητας με τη συναινετική GRE αλληλουχία. Τρία από αυτά εντοπίζονται στο γονίδιο της υπομονάδας I της οξειδάσης το κυτοχρώματος, ένα στο γονίδιο της υπομονάδας III της οξειδάσης του κυτοχρώματος και δύο στο D-βρόγχο. Η ομοιότητα με τη συναινετική αλληλουχία κυμαίνεται από 60-80%. Το GRE που εντοπίζεται στο D-βρόγχο του μιτοχονδριακού γονιδιώματος του ποντικού, είναι αλληλουχία, που συντηρείται στην ίδια περιοχή (D-βρόγχο) των μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων βοδιού και ανθρώπου. (Εικόνα 2.1.)

#### 4.2 Ο ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ ΣΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ

Με τη βοήθεια πειραμάτων με ραδιοσημασμένες ορμόνες-προσδέματα σε μιτοχονδριακά εκχυλίσματα, αποδείχθηκε η παρουσία υποδοχέων στεροειδών και θυροειδών ορμονών στα μιτοχόνδρια.

Συγκεκριμένα, Ο GR βρέθηκε σε μιτοχόνδρια στο ήπαρ αρουραίου με αδρεναλεκτομή, έπειτα 15 λεπτών χορήγηση δεξαμεθαζόνης, ενώ σε μη μεταχειρισμένα ζώα βρέθηκαν ελάχιστες ποσότητες του υποδοχέα. Ο GR εντοπίστηκε στα μιτοχόνδρια κυττάρων HeLa, σε κυτοπλασματικά και συναπτοσωμικά μιτοχόνδρια από εγκέφαλο αρουραίου, σε μιτοχόνδρια κυττάρων γλοίας του Mueller και σε C6 κύτταρα γλοίας σε αρουραίο (Nancy Cidlowski, John Cidlowski, 1981, Regulation of Glucocorticoid Receptors by Glucocorticoids in Cultured HeLa S<sub>3</sub> Cells). Ο GR εντοπίστηκε επίσης σε HepG2 κύτταρα ηπατοκαρκινώματος και SaOS-2 κύτταρα οστεοσαρκώματος. Χρησιμοποιώντας συγκεκριμένα αντισώματα έναντι των GRα και GRβ, έχει καταδειχθεί ότι ο GRα ήταν η ισομορφή που ανιχνεύθηκε στα μιτοχόνδρια, παράλληλα με την παρουσία του στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα, ενώ ο GRβ περιορίστηκε μόνο στον πυρήνα, όπου συσσωρεύεται ως επί τω πλείστον στον πυρηνίσκο. Στην Western blot παρατηρήθηκαν δύο κύριες ζώνες, οι οποίες αντιδρούν με το anti-GRα και με μοριακό βάρος 95 και 90 K (Psarra, A.M.G., Sekeris, C.E, 2007, Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: Regulatory molecules in a new environment).

#### 4.3 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ ΣΤΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΣΤΗ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΟΧΡΗΟΣ

Τα μιτοχόνδρια παρέχουν την ενέργεια που χρειάζεται το κύτταρο μέσω της οξειδωτικής φωσφυλίωσης στην αναπνευστική αλυσίδα, παράγοντας περισσότερο από το 90% του ολικού ATP. Ο μεγάλος βαθμός κατανάλωσης οξυγόνου στην αερόβια παραγωγή ATP είναι αναπόφευκτος και έχει ως συνέπεια το σχηματισμό ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS), από τις οποίες ένας μεγάλος βαθμός μπορεί να απενεργοποιηθεί με την κατάλληλη ενζυμική επεξεργασία στο μιτοχόνδριο. Στην



περίπτωση που δεν γίνει αυτό, οι ROS συσσωρεύονται με επιβλαβή αποτελέσματα στο DNA (μεταλλάξεις) και σε άλλα μακρομόρια, μειώνοντας έτσι τη διαθεσιμότητα σε ATP και αυξάνοντας το οξειδωτικό στρες, ενεργοποιεί τη μετάβαση στη διαπερατότητα των μιτοχονδριακών πόρων και την έναρξη της απόπτωσης. Τα αποτελέσματα των ROS στα μιτοχονδριακά μακρομόρια έχουν συσχετιστεί με ποικίλες ασθένειες, κυρίως νευρομυϊκές και εκφυλιστικές νόσους (Alzheimer's, Parkinson's), τη γήρανση και τον καρκίνο. Έτσι, η ρύθμιση των ενεργειακών απαιτήσεων είναι μια κύρια διαδικασία, που περιλαμβάνει μια πλειάδα από παράγοντες, που απαιτούν συντονισμό των μιτοχονδριακών διεργασιών με αυτές των άλλων κυτταρικών διαμερισμάτων. Τα μιτοχόνδρια αντιδρούν στα χαμηλά επίπεδα ADP με κινητοποίηση των μεταβολικά ανενεργών μιτοχονδρίων και με αλλοστερική ενεργοποίηση των ενζύμων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS). Η μιτοχονδριακή RNA πολυμεράση αποτελεί αισθητήρα για την αναλογία ADP/ATP. Παρ'όλα αυτά, μεγαλύτερες ενεργειακές απαιτήσεις αντιστοιχούν και σε αυξημένη βιοσύνθεση OXPHOS, αυξημένη μεταγραφή των γονιδίων για OXPHOS στον πυρήνα και στα μιτοχόνδρια και τέλος αυξημένη μιτοχονδριακή γονιδιακή δοσολογία.

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, από τις 80 υπομονάδες των συστατικών του μιτοχονδριακού αναπνευστικού συμπλέγματος, οι 13 κωδικοποιούνται από μιτοχονδριακά γονίδια και οι υπόλοιπες από πυρηνικά. Κάτω από συνθήκες σταθερής κατάστασης υπάρχει μια καθαρή σχέση μεταξύ των επιπέδων των mRNAs των OXPHOS που κωδικοποιούνται στον πυρήνα με αυτά που κωδικοποιούνται στα μιτοχόνδρια. Η μιτοχονδριακή και πυρηνική έκφραση των OXPHOS ρυθμίζεται συντονισμένα και αυτό επιτυγχάνεται κυρίως με προ-μεταφραστικούς μηχανισμούς αλλά και με μεταγραφικό έλεγχο.

Οι στεροειδείς και οι θυροειδείς ορμόνες είναι οι κύριοι ρυθμιστές του ενεργειακού μεταβολισμού και δρουν στον πυρήνα και στα μιτοχόνδρια μέσω της επαγωγής της μεταγραφής των γονιδίων OXPHOS και της βιοσύνθεσης των OXPHOS. Αν και η συντονισμένη έκφραση των πυρηνικών και μιτοχονδριακών γονιδίων OXPHOS στα αρχικά στάδια είναι γενικά αποδεκτή, αυτό δεν φαίνεται να ισχύει για όλα αυτά τα γονίδια, προτείνοντας την ύπαρξη πολλαπλών κυκλωμάτων ελέγχου. Παράλληλα με την επαγωγή της έκφρασης της ομάδας των γονιδίων που εμπλέκονται οι ορμόνες, αυτοί οι ρυθμιστικοί παράγοντες ενεργοποιούν την παραγωγή ATP που απαιτείται γι' αυτές τις διεργασίες αλλά και την αναπλήρωση των ενεργειακών αποθηκών του κυττάρου. Μερικές δημοσιεύσεις αναφέρονται στα ενεργοποιητικά αποτελέσματα των γλυκοκορτικοειδών, των οιστρογόνων, των ανδρογόνων και των θυροειδών ορμονών στη μεταγραφή των μιτοχονδριακών και πυρηνικών γονιδίων OXPHOS σε διάφορα όργανα, όπως η καρδιά, ο σκελετικός μυς, το ήπαρ, ο νεφρός και ο εγκέφαλος. Μεταξύ άλλων, έχουν καταγραφεί καλά τα αποτελέσματα των

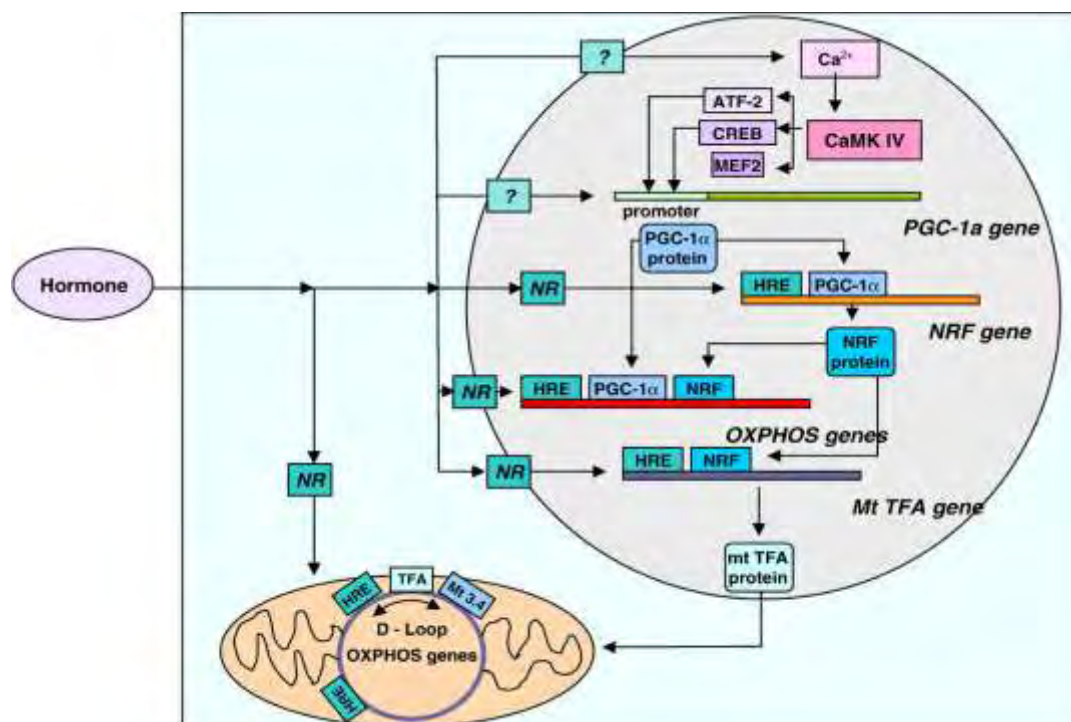
γλυκοκορτικοειδών στην αύξηση των COXI, COXIII, και των 12S RNA μεταγράφων σε σκελετικό μυ αρουραίου, των COXI, II, III, και 16S RNA στο ανιόν κόλον του παχέος εντέρου αρουραίου, των COXII σε κύτταρα H4C1 βλεννογόνου αρουραίου, και των COXIII στον ιππόκαμπο αρουραίου.

Οι υποδοχείς διεγείρουν την έκφραση των γονιδίων OXPHOS σε δύο διαφορετικά κυτταρικά οργανίδια με άμεση ενεργοποίηση των γονιδίων OXPHOS που φέρουν HREs στις ρυθμιστικές τους αλληλουχίες ή έμμεσα, με την επαγωγή των γονιδίων που περιέχουν HREs και κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες όπως NRF1 και NRF2. Επιπλέον οι ίδιοι μεταγραφικοί παράγοντες μπορούν να επάγουν τα πυρηνικά γονίδια που κωδικοποιούν μιτοχονδριακούς μεταγραφικούς παράγοντες όπως TFAM, TFB1M, TFB2M, τα οποία, ακολούθως, μπορούν να ενεργοποιήσουν την έκφραση των μιτοχονδριακών γονιδίων OXPHOS.

Η παρουσία αλληλουχιών στο μιτοχονδριακό γένωμα που είναι παρόμοιες με τα πυρηνικά HREs και ο εντοπισμός των υποδοχέων των ορμονών στα οργανίδια αυτά, υποδεικνύει την ύπαρξη ενός επιπλέον άμεσου μηχανισμού για την επαγωγή της έκφραση των μιτοχονδριακών γονιδίων OXPHOS. Το σύμπλεγμα ορμόνης-υποδοχέα μπορεί να δεσμευτεί στα HREs του μιτοχονδριακού γενώματος και να επάγουν τη μεταγραφή τους, παράλληλα με τα αποτελέσματα της ορμόνης στα πυρηνικά γονίδια OXPHOS, επιβεβαιώνοντας έτσι το συντονισμό της έκφρασης των γονιδίων σε πυρήνα και μιτοχόνδρια.

Σύμφωνα με πρόσφατα πειραματικά αποτελέσματα σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος, HepG2, έχει καταδειχθεί η ειδική σύνδεση του GR στο ρυθμιστικό D-βρόγχο του μιτοχονδριακού γονιδιώματος και η επαγωγή των μιτοχονδριακών μεταγραφικών παραγόντων A, B1 και B2, του μιτοχονδριακού ριβοσωμικού RNA, και συγκεκριμένων μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων OXPHOS από τη δεξαμεθαζόνη (ισχυρό συνθετικό μέλος της οικογένειας των στεροειδών με αντιφλεγμονώδη και αναστοκατασταλτική δράση). Έπειτα από την εφαρμογή της α-αμαντίνης, ενός ειδικού αναστολέα από την DNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση II, εξακολουθεί να διεξάγεται η επαγόμενη από δεξαμεθαζόνη μιτοχονδριακή μεταγραφή, ενώ η επίδραση της δεξαμεθαζόνης στη μεταγραφή των μιτοχονδριακών μεταγραφικών παραγόντων καταστέλλεται. Επιπλέον, κύτταρα HepG2 που υπερεκφράζουν μιτοχονδριακό σημασμένο GR παρουσίασαν αυξημένη σύνθεση RNA, έκφραση της πρωτεϊνικής υπομονάδας I της κυτοχρωμικής οξειδάσης και παραγωγή ATP. Με τα πιο πάνω ευρήματα, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να διεγείρουν άμεσα τη μιτοχονδριακή μεταγραφή μέσω του μιτοχονδριακά εντοπισμένου GR, επηρεάζοντας τη βιοσύνθεση των ενζύμων OXPHOS. Αυτό διεξάγεται συμπληρωματικά με τη δράση τους στα μιτοχονδριακά γονίδια μέσω της επαγωγής των πυρηνικά κωδικοποιούμενων

μιτοχονδριακών μεταγραφικών παραγόντων (Psarra, Sekeris, 2011, Glucocorticoids induce mitochondrial gene transcription in HepG2 cells role of the mitochondrial glucocorticoid receptor).



Εικόνα 4.1. Πυρηνική-κυτταροπλασματική οργάνωση της μεταγραφής μιτοχονδριακών και πυρηνικών γονιδίων που κωδικοποιούν υπομονάδες OXPHOS από στεροειδικές/θυρεοειδικές ορμόνες.

Στον πυρήνα, το σύμπλεγμα ορμόνης-υποδοχέα (NR) μπορεί να αλληλεπιδράσει με τα HREs των γονιδίων της OXPHOS, ώστε να τα ενεργοποιήσει άμεσα και με τα HREs των γονιδίων του πυρηνικού αναπνευστικού παράγοντα (NRF), ώστε να επάγει τους αντίστοιχους μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι μπορούν στη συνέχεια να ασκήσουν μια θετική επίδραση στην μεταγραφή πυρηνικών γονιδίων της OXPHOS. Μέσω μη γενωμικής ρύθμισης της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του  $\text{Ca}^{+2}$  και ενεργοποίησης της εξαρτώμενης από το σύστημα ασβεστίου-καλμοδουλίνης πρωτεϊνικής κινάσης IV (CaMKIV), τον κύριο ρυθμιστή της μιτογένεσης, ο ενεργοποιούμενος από τον συνενεργοποιητή 1α υποδοχέα γ (PGC-1α) επάγεται, και μπορεί άμεσα και έμμεσα (μέσω της NRF επαγωγής) να διεγείρει τη μεταγραφή των πυρηνικών γονιδίων OXPHOS και της μιτοχονδριακής μεταγραφής του παράγοντα A (TFAM), ο οποίος ενεργοποιεί τη μεταγραφή στα μιτοχόνδρια. Οι PCG1α και PPARα μπορούν να επαχθούν τόσο από θυρεοειδικές ορμόνες όσο και από γλυκοκορτικοειδή. Ο PCG1α/1β μπορεί επίσης να επαχθεί από τον IFNγ μέσω του μονοπατιού JAK/STAT1. Ο PCG1α/1β στη συνέχεια μπορεί να ενεργοποιήσει τον

συσχετιζόμενο με οιστρογόνα υποδοχέα  $\alpha$  (ERR $\alpha$ ), έναν ορφανό πυρηνικό υποδοχέα, ο οποίος με άμεση δέσμευση σε προαγωγείς γονιδίων, σημαντικών για μιτοχονδριακές λειτουργίες, όπως για την οξειδωτική φωσφορυλίωση ή σε προαγωγείς των παραγόντων που ελέγχουν μιτοχονδριακή έκφραση, να οδηγήσει σε αυξημένη μιτοχονδριακή αναπνοή και παραγωγή ROS. Στα μιτοχόνδρια, οι ορμόνες μπορούν να επηρεάσουν άμεσα τη μεταγραφή γονιδίων OXPHOS μέσω των συγγενών μιτοχονδριακών υποδοχέων και της αλληλεπίδρασης με τις αντίστοιχες θέσεις δέσμευσης στο μιτοχονδριακό γένωμα, διασφαλίζοντας το βέλτιστο συγχρονισμό της μεταγραφής των γονιδίων OXPHOS και στους δύο τύπους γενώματος (Από Scheller et al., 2000, Psarra et al., 2006). (Από Psarra et al., 2008, BBA 5, 431-436).

#### 4.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ ΣΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Τα μιτοχόνδρια λαμβάνουν και ενσωματώνουν μια σειρά από εξωγενή και ενδογενή αποπτωτικά και επιβιωτικά σήματα. Μεταξύ των κύριων αποπτωτικών σημάτων είναι οι στεροειδείς ορμόνες και τα συσσωρευμένα ευρήματα αποδεικνύουν ότι μερικά από τα ορμονικά αποπτωτικά/αντι-αποπτωτικά αποτελέσματα μεσολαβούνται από τους αντίστοιχους μιτοχονδριακούς υποδοχείς. Αναλόγως με τη φύση του κυττάρου στόχου, η ίδια ορμόνη μπορεί να δράσει ως αποπτωτικός ή επιβιωτικός παράγοντας, λόγω των ιδιαιτεροτήτων των ιστών στα μιτοχόνδρια. Η πρωτεομική ανάλυση κατέδειξε τις διαφορές στη σύνθεση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών στους διάφορους κυτταρικούς τύπους και μόνο ένα υποσύνολο από τις πρωτεΐνες είναι κοινές σε όλα τα μιτοχόνδρια. Επιπλέον, τα μιτοχόνδρια ποικίλουν στην υποδομή και στην εγγενή οξειδωτική ικανότητα φωσφορυλίωσης. Τα γλυκοκορτικοειδή προστατεύουν τα κύτταρα του επιθηλίου, για παράδειγμα του μαστικού αδένου, τα κύτταρα των ωοθυλακίων και τα ηπατοκύτταρα από τα αποπτωτικά ερεθίσματα (Necela, Cidlowski, 2004, Mechanisms of Glucocorticoid Receptor Action in Noninflammatory and Inflammatory Cells). Ωστόσο, τα γλυκοκορτικοειδή είναι αποπτωτικοί παράγοντες για τα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος, όπως τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα θυμοκύτταρα και τα λευκοκύτταρα. Ορισμένα γονίδια των εξωγενών και ενδογενών μονοπατιών θανάτου εκφράζονται με έναν προ-αποπτωτικό τρόπο στα ευαίσθητα λεμφοκύτταρα αφού εκτεθούν στα γλυκοκορτικοειδή, αν και επιπλέον σήματα απαιτούνται για να ενεργοποιηθεί η αποπτωτική διαδικασία. Οι Sionon et al χρησιμοποιώντας T-λεμφοειδείς κυτταρικές σειρές που ποικίλλουν σε ευαισθησία προς τα γλυκοκορτικοειδή, έδειξαν μια ταχεία, επαγόμενη από γλυκοκορτικοειδή μετατόπιση του GR στα μιτοχόνδρια ευαίσθητων κυττάρων, ενώ στα ανθεκτικά κύτταρα, τέτοια μετακίνηση δεν ήταν εμφανής. Επιπλέον, η πυρηνική στόχευση του

υποδοχέα μετά τη χορήγηση ορμονών, ήταν παρόμοια και στις δύο κυτταρικές σειρές. Η στόχευση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών προς τα μιτοχόνδρια, συνδέοντας τον υποδοχέα με το μιτοχονδριακό σήμα εντοπισμού της οξειδάσης του κυτοχρώματος, οδήγησε στην συσσώρευση του υποδοχέα στα μιτοχόνδρια και την απόπτωση των κυττάρων με έναν ανεξάρτητο από γλυκοκορτικοειδή τρόπο. Επιθηλιακά κύτταρα του θύμου αδένος, τα οποία προκαλούν απόπτωση της PD1.6 T-κυτταρικής σειράς με έναν τρόπο εξαρτώμενο από υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, επάγουν τη μετατόπιση του υποδοχέα προς τα μιτοχόνδρια, αλλά όχι προς τον πυρήνα, επισημαίνοντας, επίσης το ρόλο του υποδοχέα των μιτοχονδρίων στην εκμείωση της απόπτωσης. Τα αποτελέσματα αυτά είναι παρόμοια με εκείνα που λαμβάνονται από τους Li et al., οι οποίοι στοχεύουν τον πυρηνικό ορφανό υποδοχέα TR3/Nur77, ο οποίος είναι απαλλαγμένος από τομέα του με λειτουργία δέσμησης στο DNA και μεταενεργοποίησης, στα μιτοχόνδρια και παρατήρησαν έκλυση του κυτοχρώματος c και απόπτωση και με αυτά των Jeong et al., οι οποίοι πραγματοποίησαν επαγωγή της απόπτωσης από συνθετικά παράγωγα χηνοδεοξυχολικού οξέος σε καρκινικές κυτταρικές σειρές ανθρώπου, με τη μεσολάβηση TR3/Nur77 μετατόπισης στα μιτοχόνδρια. Τα πειράματα των Sionon et. al επιδεικνύουν ότι η αποκλειστική έκφραση του GR στα μιτοχόνδρια είναι επαρκής για να επαγάγει την απόπτωση.

#### 4.5 Η ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ ΜΕ ANTI-ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ Bcl-2

Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών σχηματίζει σύμπλεγμα στα Β-λεμφοκύτταρα (Bcl-2), μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια προς απάντηση στην κορτικοστερόνη (CORT) και ρυθμίζει τη συγκέντρωση του μιτοχονδριακού ασβεστίου και την οξείδωση. Επίσης, οι υποδοχείς για τις στεροειδείς και τις θυροειδείς ορμόνες ρυθμίζουν τη λειτουργία των μιτοχονδρίων για την προστασία των κυττάρων έναντι διαφόρων και ρυθμίζουν τη συναπτική πλαστικότητα. Έτσι, τα γλυκοκορτικοειδή προστατεύουν από τις μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες κατά τη διάρκεια του χρόνιου στρες και των ψυχιατρικών και νευρολογικών δυσλειτουργιών.

Μετά την έκθεση σε χαμηλή δόση CORT, ο υποδοχέας προσδένεται στην Bcl-2, μια αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη που ρυθμίζει την ακεραιότητα της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και επηρεάζει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και του ασβεστίου από τα μιτοχόνδρια.

Το σύμπλοκο GR/Bcl-2 μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια, αφού σχηματίσει σύμπλοκο με μια πρωτεΐνη θερμικού σοκ hsp70/90. Μπορεί να στοχεύσουν σε διάφορα μέρη του μιτοχονδρίου, εσωτερική και εξωτερική μεμβράνη, μιτοχονδριακή μήτρα και

διαμεμβρανικό χώρο, ανάλογα με τη σηματοδότηση στην πρωτεΐνη. Αλλά ο υποδοχέας μετατοπίζεται στη μήτρα του μιτοχονδρίου. Επίσης, μια άλλη συνοδός πρωτεΐνη που προσδένεται στην Bcl-2, είναι η Bag-1. Εκεί, ρυθμίζει με ένα U-shaped τρόπο τα επίπεδα του ασβεστίου, την οξειδωση και το δυναμικό της μεμβράνης.

Με την έκθεση σε υψηλές δόσεις CORT, μειώνεται το επίπεδο των GR/Bcl-2 στα μιτοχόνδρια. Στην περίπτωση αυτή, η Bcl-2 δρα στη διαπερατότητα της μεμβράνης, αφού αναστέλλει το σχηματισμό πόρων που περιέχουν προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bax στη μιτοχονδριακή εξωτερική μεμβράνη και μειώνει την απελευθέρωση του ασβεστίου και του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια. Αυτό αντιστοιχεί στην νευροπροστατευτική δράση της CORT σε χαμηλές δόσεις. Σε υψηλές δόσεις, ενισχύει την τοξικότητα του καϊνικού οξέος στους νευρώνες.

#### 4.6 Η ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ Trx-2 ΜΕ ΤΟΝ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ

Η Trx2 (μιτοχονδριακή θειορεδοξίνη) είναι ένας αντιοξειδωτικός και αντι-αποπτωτικός παράγοντας σημαντικός για τη βιωσιμότητα του κυττάρου. Η Trx1 (κυτταροπλασματική θειορεδοξίνη) είναι ένας συμπαράγοντας και ρυθμιστής των ευαίσθητων σε οξειδοαναγωγή μεταγραφικών παραγόντων όπως είναι ο GR και ο NF-κΒ (πυρηνικός παράγοντας κΒ). Και οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες έχουν εντοπιστεί στα μιτοχόνδρια και έχουν προταθεί να παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής και στην απόπτωση.

Οι μιτοχονδριακές ρίζες ROS παράγονται ως παρα-προϊόντα του ατελούς οξειδωτικού μεταβολισμού και μπορεί να προκαλέσουν διάφορες κυτταρικές βλάβες μέσω της οξείδωσης λιπιδίων, πρωτεϊνών και μιτοχονδριακού DNA. Οι ROS έχουν επίσης ταυτοποιηθεί ως δεύτεροι αγγελιοφόροι που παίζουν ρόλο σηματοδοτικού υποδοχέα και μετα-μεταφραστικών τροποποιητικών σηματοδοτικών μορίων. Το μιτοχόνδριο φιλοξενεί ποικίλα ενζυμικά αντιοξειδωτικά αμυντικά συστήματα, ανάμεσα σ' αυτά το σύστημα θειορεδοξίνης-περοξειρεδοξίνης, που χρησιμοποιείται για την προστασία από οξειδωτικές βλάβες και τη συνδεσμολογία του οργανιδίου.

Μέσω pull-down πειραμάτων (δοκιμές με in vitro μεθόδους που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό της φυσικής αλληλεπίδρασης μεταξύ δύο ή περισσότερων πρωτεϊνών), έχει αποδειχθεί η άμεση αλληλεπίδραση της Trx2 με τον GR, όπως και με περικομμένες μορφές του GR που φέρουν είτε την περιοχή πρόσδεσης είτε την περιοχή πρόσδεσης στο DNA. Τα ευρήματα αυτά καταδεικνύουν την ύπαρξη δύο περιοχών πρόσδεσης της Trx2 στο μόριο του GR. Η θειορεδοξίνη μπορεί να κρατά την περιοχή δέσμευσης και την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του υποδοχέα σε μια

ανηγμένη ενεργή μορφή, επιτρέποντας έτσι την αλληλεπίδραση του GR με το πρόσδεμά του και το DNA. Η αλληλεπίδραση αυτή (GR-Trx2) δεν επηρεάζεται από την παρουσία συγκεκριμένων αγωνιστών ή ανταγωνιστών του GR, καθώς επίσης και από την οξειδωαναγωγική κατάσταση της Trx2.

Πρόσφατα, έχει αναφερθεί ότι η Trx2 μπορεί να καταλύσει την δινιτριλύωση των πρωτεϊνών, που αποτελεί διαδικασία ελέγχου της πρόσδεσης του GR με το πρόσδεμα. Έτσι, η ισχυρή αλληλεπίδραση του GR με την Trx2 προτείνει τον κρίσιμο ρόλο της Trx2, όχι μόνο στη διατήρηση του μιτοχονδριακού GR σε μια πλήρη ανηγμένη ενεργή μορφή, αλλά και στη διαφύλαξή του σε ένα διαμορφωτικό στάδιο που τον καθιστά ικανό να αλληλεπιδράσει με άλλα ρυθμιστικά μόρια στο μιτοχονδριακό περιβάλλον.

Η υψηλή συγγένεια της Trx2 με τον GR υποδεικνύει την πιθανή ανάμειξη του GR στις μιτοχονδριακές λειτουργίες, όπως η ρύθμιση της μεταγραφής, στην οποία ο μιτοχονδριακός GR πρέπει να εμπλέκεται. Πρόσφατα έχουν προταθεί στοιχεία για την GR-εξαρτώμενη ρύθμιση διάφορων γονιδίων ενζύμων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, όπως το COX I, COX III και Cytb. Τα αποτελέσματά από τα πειράματα με real-time PCR αποκάλυψαν μια Trx2-εξαρτώμενη επαγωγή της έκφρασης του Cytb, υπό συνθήκες DEX-επαγόμενης ενεργοποίησης του GR και επιπλέον στηρίζουν την υπόθεση της εμπλοκής της Trx2 στην ενεργοποίηση του μιτοχονδριακού GR. Ένα αντίθετο αποτέλεσμα της Trx2 στην έκφραση του Cytb παρατηρήθηκε μετά την προεπώαση των κυττάρων με τον TNFα, ένα γνωστό ενεργοποιητή του NF-κΒ. Είναι γνωστό πως ο GR αλληλεπιδρά και εξασθενεί τις λειτουργίες του NF-κΒ στον πυρήνα (Psarra, A.M.G., Hermann, S., Panayotou, G., Spyrou G., 2009, Interaction of mitochondrial thioredoxin with glucocorticoid receptor and NF-kappaB modulates glucocorticoid receptor and NF-kappaB signalling in HEK-293 cells).

#### 4.7 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Στα καρκινικά κύτταρα, ο αριθμός των μιτοχονδρίων ελαττώνεται σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα, πιθανότατα λόγω μείωσης της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και αύξησης της γλυκολυτικής δράσης των κυττάρων (αποτέλεσμα Warburg) (Warburg, 1956).

Είναι γνωστό εδώ και δεκαετίες ότι οι όγκοι εμφανίζουν αυξημένους ρυθμούς στην πρόσληψη της γλυκόζης. Αυτοί οι αυξημένοι ρυθμοί επεξεργασίας της γλυκόζης δεν είναι θεμελιώδεις στην ανάπτυξη του καρκίνου, αλλά μπορούν να δώσουν ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα στα καρκινικά κύτταρα. Τα καρκινικά κύτταρα αυξάνονται ταχύτερα από ότι τα αιμοφόρα αγγεία που τα τρέφουν. Έτσι, καθώς οι συμπαγείς

όγκοι μεγαλώνουν , είναι ανίκανοι να οξυγονωθούν αποτελεσματικά, εμφανίζουν υποξία κατά τα αρχικά στάδια. Κάτω από τις συνθήκες αυτές, η γλυκόλυση που οδηγεί στη ζύμωση του γαλακτικού οξέος γίνεται η πρωταρχική πηγή ATP.

Η γλυκόζη είναι το κύριο συστατικό που καταβολίζεται στα υγιή κύτταρα, ενώ τα καρκινικά κύτταρα συνήθως βασίζονται στον καταβολισμό και της γλυκόζης και της γλουταμίνης. Το οργανίδιο κλειδί που εμπλέκεται σε αυτόν το διαφορετικό τύπο μεταβολισμού, είναι τα μιτοχόνδρια, τα οποία συντονίζουν τον καταβολισμό της γλυκόζης και της γλουταμίνης. Στοχεύοντας στο μιτοχονδριακό μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων, είναι ζωτικής σημασίας για τη θεραπεία της ασθένειας αυτής.

Ο κύκλος του κιτρικού οξέος, ή κύκλος του Krebs, υπό κανονικές συνθήκες συνεχίζει τον καταβολισμό της γλυκόζης, συνδέοντας τη γλυκόλυση με την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Κάτω από υποξικές συνθήκες, η παραγωγή ATP μέσω της μετατροπής της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό οξύ είναι εγγυημένη από τη συνεχή παραγωγή NAD που ακολουθείται από τη μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε γαλακτικό οξύ, μια αντίδραση που καταλύεται από τη γαλακτική δεϋδρογονάση 5 (LDH5). Η διαδικασία αυτή ονομάζεται αναερόβια γλυκόλυση. Όπως προαναφέρθηκε, στα καρκινικά κύτταρα το πυροσταφυλικό οξύ μετατρέπεται με άφθονο τρόπο σε γαλακτικό οξύ, ανεξάρτητα από την παρουσία οξυγόνου (αερόβια γλυκόλυση, φαινόμενο Warburg).

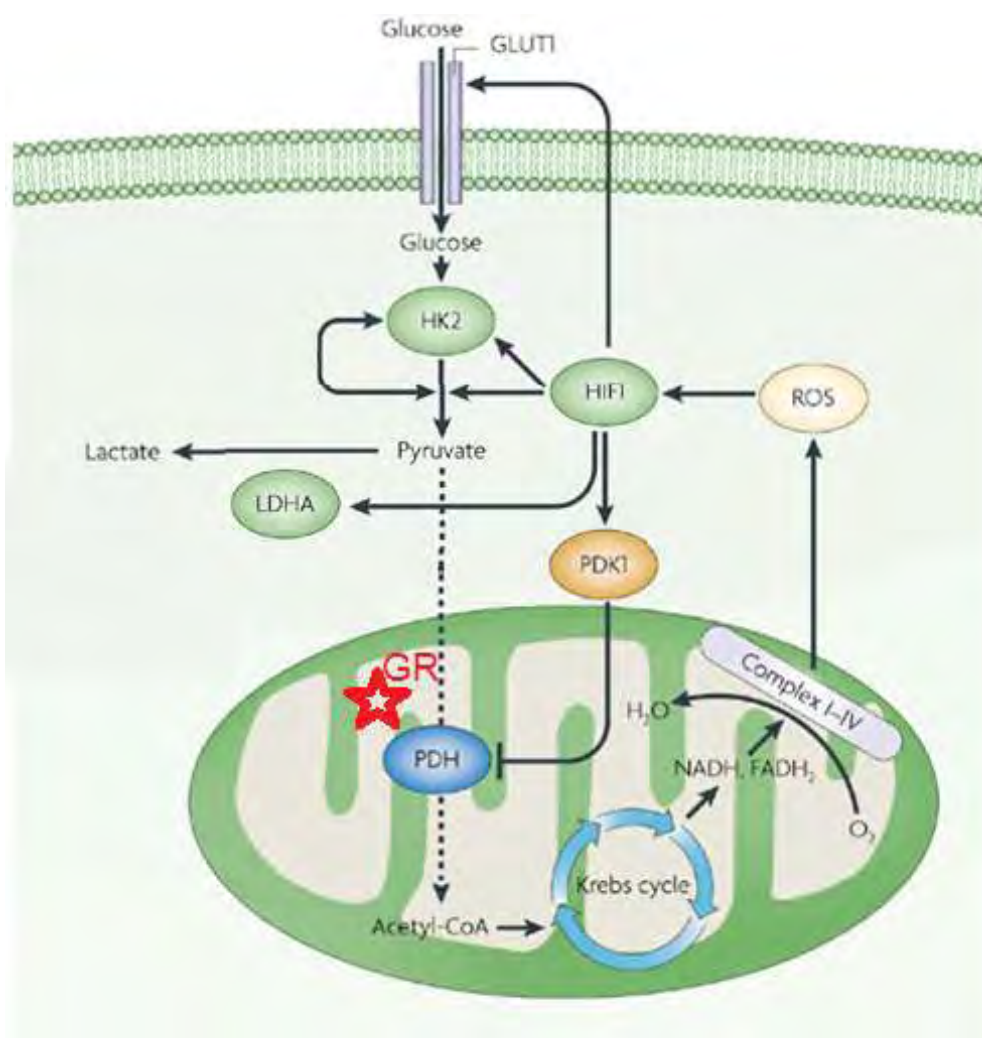
Η πυροσταφυλική δεϋδρογονάση (PDH) είναι το συνδετικό βήμα μεταξύ της γλυκόλυσης και του κύκλου του κιτρικού οξέος. Ακολουθώντας την είσοδο του πυροσταφυλικού οξέος στα μιτοχόνδρια, από έναν άγνωστο ακόμα μεταφορέα, η PDH καταλύει τη μετατροπή του σε ακέτυλο-CoA, σε μια μη αναστρέψιμη αντίδραση. Η δράση της PDH ρυθμίζεται με φωσφορυλίωση, η οποία ελέγχεται από δύο ένζυμα την PDH κινάση και την PDH φωσφατάση. Η PDH είναι ανενεργή στη φωσφορυλιωμένη της κατάσταση.

Η βιολογική βάση αυτής της εντατικοποίησης της γλυκόλυσης και της μετατροπής του πυροσταφυλικού σε γαλακτικό οξύ στα καρκινικά κύτταρα, πιστεύεται ότι συνδέεται με τον HIF1α, ένα παράγοντα μεταγραφής, ο οποίος επάγεται από την υποξία, ο HIF-1, και αυξάνει την έκφραση γλυκολυτικών ενζύμων και μεταφορέων της γλυκόζης στο εσωτερικό του κυττάρου, αυξάνοντας την πρόσληψή της. Επιπλέον, ο HIF-1 επάγει σηματοδοτικά μονοπάτια για αύξηση του αγγειακού επιθηλίου, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη του όγκου (Βιβλίο ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ, ΤΟΜΟΣ 1, Berg, Tymoczko, Stryer, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2007).

Ο HIF-1 έχει την ιδιότητα να επάγει την έκφραση υψηλών επιπέδων της PDH κινάσης στα καρκινικά κύτταρα έτσι ώστε να διατηρούν την PDH στην ανενεργή της μορφή. Αναφορικά με τη δράση του στα γλυκολυτικά ένζυμα, ο κύριος στόχος του είναι η εξοκινάση (HK). Συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση της εξοκινάσης



οδηγεί σε σημαντική καταστολή της απόπτωσης με τη μετατόπιση της ενεργής εξοκινάσης από το κυτταρόπλασμα προς τη μιτοχονδριακή μεμβράνη όπου αλληλεπιδρά και καταστέλλει διάφορα βασικά συστατικά των μιτοχονδρίων από τα οποία εξαρτάται η απόπτωση. Ο προαγωγέας του γονιδίου της εξοκινάσης φέρει στοιχεία απόκρισης στον HIF-1, καθώς και σε μεταγραφικούς παράγοντες που εκφράζονται από ογκογονίδια όπως ο c-myc. Επίσης στη θετική ρύθμιση της δράσης της εξοκινάσης, συμβάλει η Akt κινάση και η αναστολή τη δράσης του ανταγωνιστικού μορίου της Akt κινάσης, PTEN, στα περισσότερα είδη καρκίνου. Με τον τρόπο αυτό ενεργοποιείται η δράση της εξοκινάσης και το κύτταρο οδηγείται στη γλυκόλυση σε βάρος της οξειδωσης της γλυκόζης μέσα στο μιτοχόνδριο. Επιπλέον, η έλλειψη της p53 που ρυθμίζει την έκφραση της οξειδάσης του κυτοχρώματος c, ένα σημαντικό μέρος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια, επάγει μεταβολικές και μιτοχονδριακές μεταβολές, συμβατές με το γλυκολυτικό φαινότυπο.



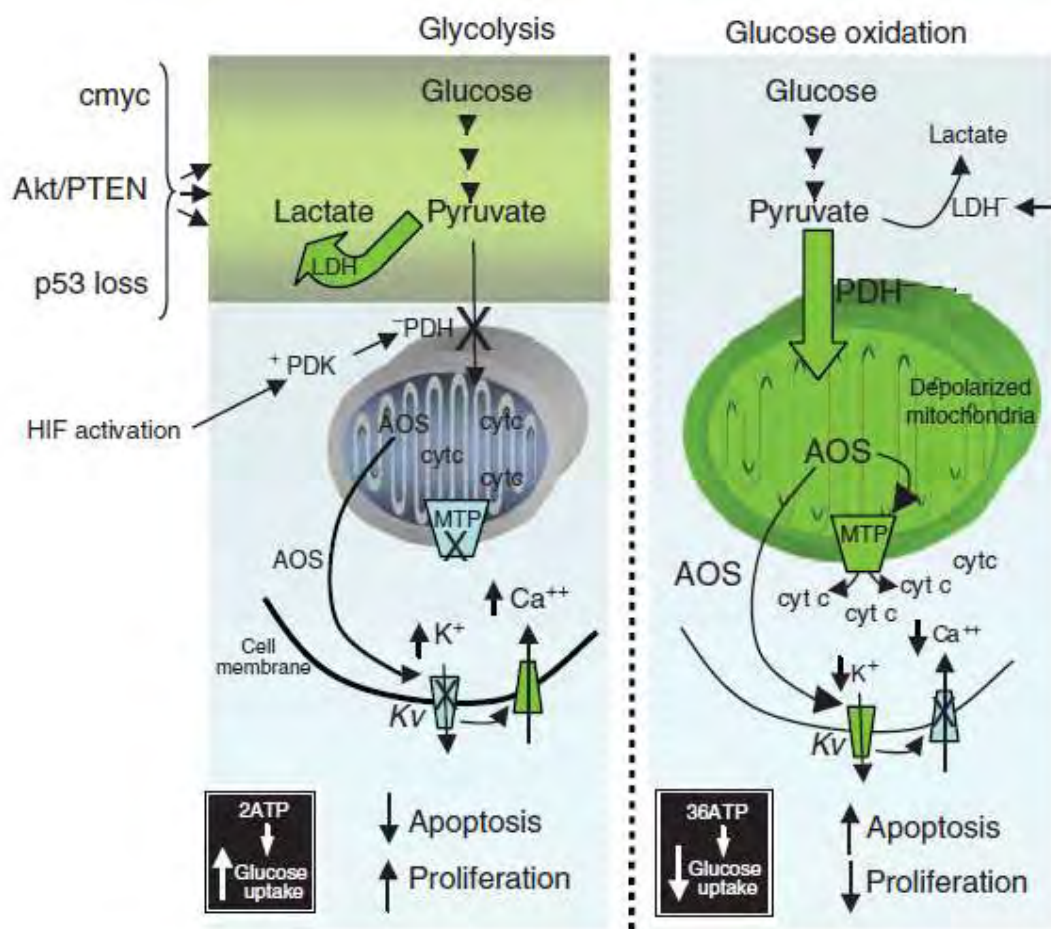
Εικόνα 4.2. Φαινόμενο Warburg. Η γλυκόζη μεταφέρεται διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης. Ο επαγόμενος από υποξία παράγοντας (Hypoxia-inducible factor 1) (HIF1), ενεργοποιεί την κινάση της PDH (PDK1) με αποτέλεσμα την ενίσχυση της

αερόθιας γλυκόλυσης δηλαδή μετατροπή της γλυκόζης σε γαλακτικό οξύ ανεξάρτητα από την παρουσία οξυγόνου). (Chi V. Dang, Jung-whan Kim, Ping Gao & Jason Yustein, (2008). *The interplay between MYC and HIF in cancer. Nature Reviews Cancer* 8, 51-56). Στο σχήμα φαίνεται η πιθανή στόχευση του GR για την ανατροπή του φαινομένου αυτού.

Όπως προαναφέραμε, η απομάκρυνση από το μεταβολισμό της γλυκόζης μέσω της οξείδωσης της από τα μιτοχόνδρια, προσδίδει στα καρκινικά κύτταρα την ικανότητα πολλαπλασιασμού και τη μειωμένη απόπτωση. Οι προ-αποπτωτικοί παράγοντες, όπως το κυτόχρωμα c (cytc) και οι παράγοντες που επάγουν απόπτωση (AOS), βρίσκονται περιορισμένοι στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων. Η έξοδος των προ-αποπτωτικών παραγόντων μεσολαβείται από το διαμεμβρανικό τασεο- και οξειδο-ευαίσθητο πόρο (MTP), ο οποίος ανάγει και απελευθερώνει τους παράγοντες στο κυτταρόπλασμα. Η διάχυση των AOS και του cytc στο κυτταρόπλασμα, επάγει την αποπτωτική διαδικασία. Το άνοιγμα του MTP, προκαλεί η παραγωγή ROS και η μεταβολή του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης, τα οποία εξαρτώνται από τη λειτουργία της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC). Η επίδραση της ETC, επηρεάζεται από την παραγωγή NADH και FADH<sub>2</sub>, που είναι δότες ηλεκτρονίων στον κύκλο του Krebs.

Η αναστολή της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης, προκαλεί τη μείωση της εισόδου του πυροσταφυλικού οξέος στα μιτοχόνδρια με αποτέλεσμα να μην διεξάγονται οι αντιδράσεις του κύκλου του Krebs και κατά συνέπεια να αναστέλλεται η λειτουργία της αλυσίδας ηλεκτρονίων. Τα γεγονότα αυτά οδηγούν στην εκπόλωση της μεμβράνης των μιτοχονδρίων και επομένως να εμποδίζεται το άνοιγμα του MTP, με αποτέλεσμα το κύτταρο να μην μπορεί να οδηγηθεί σε απόπτωση.

Επιπλέον, η αυξημένη είσοδος ασβεστίου στα καρκινικά κύτταρα, συμβάλλει στην αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και συμβάλλει στη δράση πολλών μεταγραφικών παραγόντων. Επιπλέον, στα καρκινικά κύτταρα λόγω της παρεμπόδισης της εξόδου των AOS από τα μιτοχόνδρια προς το κυτταρόπλασμα, αναστέλλεται η δράση του καναλιού K<sup>+</sup>, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του K<sup>+</sup> και να αναστέλλεται η δράση διάφορων κασπασών, που μεσολαβούν στην κυτταρική απόπτωση. (Michelakis, L Webster and JR Mackey, 2008, Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer)



Εικόνα 4.3. Το περιβάλλον γλυκόλυσης σχετίζεται με αντι-αποπτωτικό και προ-πολλαπλασιαστικό στάδιο, που χαρακτηρίζει τους όγκους. Αυξημένη είσοδος του πυροσταφυλικού οξέος μέσα στα μιτοχόνδρια λόγω της ενεργοποίησης της PDH μέσω της αλληλεπίδρασης με συγκεκριμένα μόρια (είτε μέσω της αναστολής της LDH, γαλακτικής δεϋδρογονάσης από το LDH siRNA), προάγει την οξείδωση της γλυκόζης, αυξάνοντας την απόπτωση και μειώνοντας τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. (Michelakis, L Webster and JR Mackey, 2008, Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer)

Στην παρούσα μελέτη, μέσα από ανοσοχημικές μεθόδους, εξετάζεται η αλληλεπίδραση της PDH και πιθανόν η ενεργοποίησή της από το μιτοχονδριακό υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Η χορήγηση του πυροσταφυλικού οξέος στον κύκλο του κιτρικού οξέος, θα μπορούσε να αναστρέψει το γλυκολυτικό φαινότυπο των καρκινικών κυττάρων, με αποτέλεσμα να μειώνεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και να οδηγούνται σε απόπτωση.

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών δρα ως μεταγραφικός παράγοντας που ενεργοποιείται μετά από σύνδεση της αντίστοιχης ορμόνης και επιδρά στην έναρξη της μεταγραφής, μέσω της αλληλεπίδρασης με ειδικές αλληλουχίες του DNA (GREs, στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή) όσο και με στοιχεία της βασικής μεταγραφικής μηχανής.

Μέχρι πρόσφατα, η μοναδική πρωτογενής δράση των γλυκοκορτικοειδών θεωρούνταν το πυρηνικό γονιδίωμα. Τα τελευταία χρόνια πειραματικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι τα γλυκοκορτικοειδή μπορεί να έχουν και μη γενωμικές δράσεις μέσω μεμβρανικών υποδοχέων, όπως επίσης μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση γονιδίων αναπνευστικής αλυσίδας - οξειδωτικής φωσφορυλίωσης μέσω έμμεσης πυρηνικής δράσης. Επίσης, στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα, εντοπίστηκαν αλληλουχίες που εμφανίζουν ομοιότητα με τα GREs. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα πειραμάτων ενδοκυτταρικής κατανομής στεροειδών ορμονών και την επίδραση των ορμονών στη σύνθεση του μιτοχονδριακού RNA, οδήγησαν στην υπόθεση ότι, οι γνωστές βιοχημικές και μορφολογικές επιδράσεις των στεροειδών ορμονών στα μιτοχόνδρια, είναι αποτέλεσμα και απευθείας δράσης των ορμονών αυτών στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα, διαμέσου ενός μηχανισμού, παρόμοιου με αυτόν της δράσης τους στον πυρήνα, μηχανισμού, που επιτρέπει τη συγχρονισμένη ρύθμιση και παραγωγή ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας, που κωδικοποιούνται τόσο από πυρηνικά όσο και από μιτοχονδριακά γονίδια.

Ο συντονισμός αυτός θα μπορούσε να επιτευχθεί σε μεταγραφικό επίπεδο, με τη ρύθμιση της έκφρασης μιτοχονδριακών και πυρηνικών γονιδίων, με τη βοήθεια της ύπαρξης κοινών cis στοιχείων και trans acting παραγόντων του μεταγραφικού ρυθμιστικού μηχανισμού μεταξύ των δύο κυτταρικών διαμερισμάτων. Η επίδραση των γλυκοκορτικοειδών στις μιτοχονδριακές δράσεις και μεταβολισμό είναι τεκμηριωμένη. Το ερώτημα που προκύπτει αφορά τη φύση της δράσης και το ρόλο του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στο μιτοχονδριακό περιβάλλον. Πρόσφατα επιβεβαιώθηκε ότι ο μιτοχονδριακός υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών επάγει ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής μεταγραφής μέσω απευθείας σύνδεσής του με τη ρυθμιστική D-loop περιοχή του μιτοχονδριακού DNA. Η περαιτέρω διερεύνηση του λεπτού μηχανισμού ρύθμισης της δράσης του αφορά τον χαρακτηρισμό των μορίων που αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα στην περιοχή έναρξης της μιτοχονδριακής μεταγραφής αλλά και γενικότερα στο μιτοχονδριακό περιβάλλον. Η εργασία αυτή στοχεύει στη μελέτη και το χαρακτηρισμό των μορίων που αλληλεπιδρούν με το μιτοχονδριακό υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Ο

χαρακτηρισμός των μορίων αυτών θα συμβάλλει στην περαιτέρω κατανόηση των φυσιολογικών μηχανισμών δράσης του υποδοχέα στο μιτοχονδριακό περιβάλλον, των οποίων η απόκλιση από τη φυσιολογική δράση μπορεί να έχει επιπτώσεις σε παθολογικές καταστάσεις όπως αυτής της ανάπτυξης και εξέλιξης του καρκίνου

## 3.1 ΥΛΙΚΑ

### **3.1.1 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ**

1) Θρεπτικό διάλυμα για καλλιέργεια κυττάρων:

- DMEM
- FBS 10%
- 1/100 Πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη
- 2 mM L-γλουταμίνη

2) Κρυοπροστατευτικό διάλυμα κυττάρων:

- DMSO 10%
- FBS 90%

3) Διαλύματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου:

I. Ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου (1x Running buffer):

- 25mM Tris, pH 8,3
- 192mM Γλυκίνη
- 0,1% SDS

II. Διαλύματα stock για πήκτωμα ακρυλαμίδιου:

- Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS-HCl 1,5M, pH 8,8
- Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS-HCl 1,5M, pH 6,8
- SDS 10% v/w
- Ακρυλαμίδιο 40% v/w (ακρυλαμίδιο/bis-ακρυλαμίδιο : 29/1)
- ddH<sub>2</sub>O

III. Loading Buffer:

- 1,5M Tris pH 6.8

- 10% Γλυκερόλη
- 10% SDS
- 5% β-Μερκαπτοαιθανόλη
- 1% Μπλε της βρωμοφαινόλης

#### 4) Διαλύματα για το πήκτωμα ακρυλαμιδίου:

Ανάλογα με τις διαστάσεις της πηκτής πολυακρυλαμιδίου, αναζητούμε τους πίνακες για την ποσότητα των διαλυμάτων stock που θα πρέπει να αναμείξουμε και προσθέτουμε στο τέλος τους καταλύτες APS 10% και TEMED.

#### 5) Διαλύματα για ανοσοαποτύπωση (Western blot) σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης:

##### I. Transfer buffer 1x:

- 25mM Tris
- 192mM Γλυκίνη
- 0,1% SDS
- Μεθανόλη 20%

##### II. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών [Phosphate Buffer Salts (PBS)] (1x):

- 137mM NaCl
- 2.7mM KCl
- 4.3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 1.47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

#### 6) Blocking Buffer:

- 10ml PBST
- 1g Άπαχο γάλα σε σκόνη (10% milk)

#### 7) Διάλυμα για πλύσεις μεμβράνης νιτροκυτταρίνης:

- PBST (0,1% Tween 20 σε 100ml PBS και 900ml dH<sub>2</sub>O)

#### 8) Διαλύματα για ανίχνευση σήματος:

- ECL: Solution A και B (Chemicon)

- Διάλυμα ανάπτυξης σήματος (Kodak)
- Διάλυμα μονιμοποίησης σήματος (Kodak)

9) Διαλύματα για Ανοσοκατακρήμνιση:

#### RIPA buffer

- 10 mM Tris/HCl, pH 8.0,
- 150 mM NaCl
- 1mM EDTA
- 0.1% Nonidet P40 μαζί με αναστολείς πρωτεασών

#### PBS x10

- 91mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 17mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 1500 mM NaCl

#### Lysis buffer

- DDT
- RIPA Buffer
- Αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών
- 200mM PMSF

### **3.1.2 ΧΗΜΙΚΑ**

- APS (Ammonium Persulfate) (Sigma)
- DMEM (Sigma, Gibco)
- Fetal Bovine Serum FBS (Gibco)
- HCl (Merck)
- KCl (Merck)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck)



- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merck)
- NaCl (Panreac)
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Merck)
- NaOH (Merck)
- SDS (Sodium dodecyl sulfate) (Sigma)
- Skimmed Milk (Rezilait)
- Temed (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) (Research Organics)
- Tris base (Merck)
- Trypsin-EDTA 5% 10x (Gibco)
- Tween 20 (Euroclone)
- Αιθανόλη (Merck)
- Ακρυλαμίδιο (Sigma)
- β-Μερκαπτοαιθανόλη (Riedel-de Haen)
- Γλυκερόλη (Panreac)
- Γλυκίνη (AppliChem)
- Bis-ακρυλαμίδιο (Sigma)
- Μεθανόλη (Merck)
- Μembrάνη νιτροκυτταρίνης whatman (Protran)
- Μπλε της βρωμοφαινόλης (Research Organics)

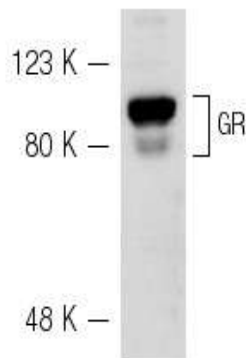
### 3.1.3 ANTISΩΜΑΤΑ

1) 2F8 μονοκλωνικό αντίσωμα anti-GR:

**Ευγενική προσφορά του Δρ. Μιχάλη Αλέξη από το Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών.**

2) H300 πολυκλωνικό αντίσωμα από κόνικλο (Santa-Cruz):

**GR (H-300) Antibody: sc-8992**



(Από <http://www.scbt.com/>)

3) Against C-terminal of TFAM:

**ARP36993\_P050 TFAM**



(Από <http://www.avivasysbio.com/>)

4) Against the middle region of TFAM:

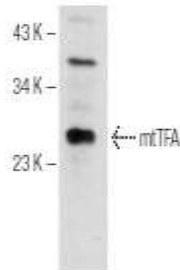
**ARP58722\_P050 TFAM**



(Από <http://www.avivasysbio.com/>)

5) goat mTFA A-16:

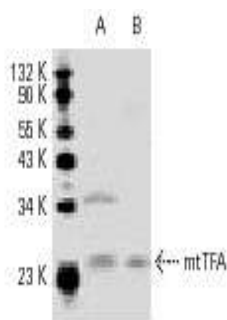
**mtTFA (A-16) Antibody: sc-30962**



(Από <http://www.scbt.com/>)

6) goat mTFA K-18:

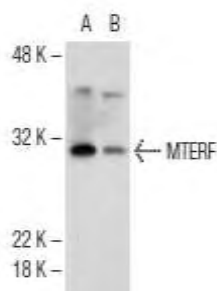
**mtTFA (K-18) Antibody: sc-19050**



(Από <http://www.scbt.com/>)

7) goat mTERF T-14:

**MTERF (T-14) Antibody: sc-160543**



(Από <http://www.scbt.com/>)

8) TFB1M:

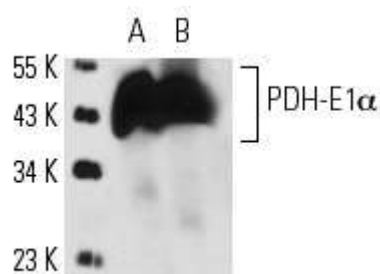
**TFB1M antibody (ARP34544)**

9) TFB2M:

**TFB2M antibody (ARP39549)**

10)  $\alpha$ -PDH mouse:

**PDH-E1 $\alpha$  (9H9) Antibody: sc-65242**



(Από <http://www.scbt.com/>)

11) mouse-IgG, Rabbit-IgG: control για ανοσοκατακρήμνιση.

12) anti-rabbit HRP, anti-goat HRP, anti-mouse HRP: δευτερογενή για western blot.

### 3.1.4 ΟΡΓΑΝΑ

Τα πειράματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας εκπονήθηκαν με τη βοήθεια οργάνων και αναλώσιμων υλικών από το Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και από την Αίθουσα Κυτταροκαλλιιεργειών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας .

- Φυγόκεντρος τύπου centrifuge 5810R eppendorf
- Φυγόκεντρος τύπου centrifuge 5415R (P Selecta)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Bio-rad)
- Συσκευή ηλεκτρομεταφοράς για western blot (semidry transfer system, Wealtec Yrdimes)
- Ζυγός (KERN)
- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής αέρα (Laminar Air Flow – AV-30/70)
- Επωαστικός Κλίβανος (New Brunswick / Galaxy 170)
- Υδατόλουτρο (P Selecta / Precisdig)
- Μικροσκόπιο (Krüss Optronic)
- Sonicator

## 3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

### **3.2.1 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ:**

#### Κυτταρική σειρά:

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HepG2 (Human hepatocellular liver carcinoma cell line). Πρόκειται για μια αθανатоποιημένη κυτταρική σειρά από ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (τα κύτταρα αυτά απομονώθηκαν αρχικά από τον ηπατικό ιστό ενός δεκαπεντάχρονου αγοριού με διαφοροποιημένο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα.

Τα HepG2 mtGFPGR είναι κύτταρα τα οποία εκφράζουν σταθερά τον ανθρώπινο υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με μια μιτοχονδριακά στοχευμένη πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) στο αμινοτελικό του άκρο. Ανθρώπινα κύτταρα HepG2, καλλιεργούνται και προετοιμάζονται για διαμόλυνση. Για να επιτευχθεί η σταθερή έκφραση του μιτοχονδριακού GR, η ακόλουθη αλληλουχία: atggctcagcgacttcttctgaggaggttctggcctctgtcatctccaggaagccctctcagggtcagtgccaccctc acttcagagccctgcagacccacaatgcagtcctggctgctgtaacacccaaccagcccgacaatatcac cagcaggtatctccttgaca, η οποία κωδικοποιεί ένα μιτοχονδριακά στοχευμένο πεπτίδιο, εισάγεται σε πλαίσιο μαζί με το ενισχυμένο γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (enhanced GFP), μεταξύ των περιοχών NheI και AgeI του φορέα pEGFPC2 (Clontech), για την παραγωγή του pmtEGFPC2 πλασμιδίου. Ακολούθως, το γονίδιο του ανθρώπινου GR (X03225 accession no.) εισάγεται στο pmtEGFPC2 στην περιοχή BamHI (pmtEGFPC2-GR). Ο φορέας επιμολύνει τα HepG2 κύτταρα και το pmtEGFPC2-GR μεταφέρεται στο εσωτερικό τους με τη χρήση Lipofectamine 2000. (Psarra, A.M.G., Sekeris, C.E. (2011). Glucocorticoids induce mitochondrial gene transcription in HepG2 cells role of the mitochondrial glucocorticoid receptor.)

#### Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς:

Τα κύτταρα HepG2 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM με περιεκτικότητα D-γλυκόζης 4.5g/L, εμπλουτισμένο με 10% εμβρυϊκό ορό βοός θερμικά απενεργοποιημένο (Fetal Bovine Serum, FBS), 100U/ml πενικιλίνη, 100μg/ml στρεπτομυκίνη και 2mM L-γλουταμίνη. Το DMEM είχε pH=7,4, περιείχε ρυθμιστικά διαλύματα, αυξητικούς παράγοντες και δείκτη phenol red με χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα το οποίο μεταβάλλεται σε πορτοκαλί-κίτρινο με την πάροδο του χρόνου, λόγω της αντίστοιχης μεταβολής του pH, το οποίο μειώνεται από την

παρουσία των όξινων μεταβολιτών που παράγουν τα κύτταρα. Η αλλαγή στο χρώμα του μέσου, αποτελεί δείγμα ότι το μέσο πρέπει να αντικατασταθεί.

Το FBS είναι ορός από το αίμα εμβρύου βοοειδούς, πρόκειται δηλαδή για το πλάσμα του αίματος χωρίς να περιέχει την πρωτεΐνη ινωδογόνο, η οποία μετατρέπεται σε ινώδες. Αποτελεί το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο συμπλήρωμα μέσου για τις *in vitro* καλλιέργειες ευκαρυωτικών κυττάρων. Αυτό οφείλεται στη χαμηλή περιεκτικότητα σε αντισώματα και στο γεγονός πως περιέχει πολλούς αυξητικούς παράγοντες, καθώς και μια μεγάλη ποικιλία από πρωτεΐνες που επιτρέπουν στα κύτταρα υπό καλλιέργεια να επιβιώσουν, να αναπτυχθούν και να διαιρεθούν.

Το υλικό των καλλιεργειών ανανεωνόταν κάθε 48 h και κάθε τρίτη ή τέταρτη μέρα τα κύτταρα HerG2 ανακαλλιεργούνταν με τη βοήθεια διαλύματος Trypsin/EDTA. Η θρυψίνη είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο το οποίο χρησιμοποιείται για τη διάσπαση των διακυτταρικών δεσμών καθώς και των δεσμών των κυττάρων με τους οποίους βρίσκονται προσκολλημένα στη φλάσκα, με αποτέλεσμα το διαχωρισμό και την αποκόλληση των κυττάρων.

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 37°C και υγρή ατμόσφαιρα 95% αέρος και 5% διοξειδίου του άνθρακα (CO<sub>2</sub>).

#### Ανακαλλιέργεια μονόστοιβης καλλιέργειας με θρυψίνη (θρυψινοποίηση):

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε πραγματοποιήθηκε υπό άσηπτες συνθήκες (θάλαμος κάθετης νηματικής ροής αέρα, Laminar Air Flow). Η ανάγκη για θρυψινοποίηση των κυττάρων παρουσιάζεται όταν η επιφάνεια του ταπήτιου της φλάσκας καλύπτεται από τα συνεχώς αναπτυσσόμενα κύτταρα κατά 80% και πάνω. Στην περίπτωση αυτή τα κύτταρα αρχίζουν να αντιμετωπίζουν δυσκολία για να πολλαπλασιαστούν γιατί δεν υπάρχει αρκετός χώρος. Αν δεν πραγματοποιηθεί η διαδικασία της ανακαλλιέργειας, τότε τα κύτταρα είναι πιθανόν να αρχίσουν να αναπτύσσονται σε περισσότερες από μία στοιβάδες, με αποτέλεσμα στο μικροσκόπιο να παρατηρούνται πυκνές περιοχές με έντονο χρώμα που αντιπροσωπεύουν την προς τα πάνω ανάπτυξη των κυττάρων. Για να αποφευχθούν τέτοιου είδους φαινόμενα και για να δοθεί περισσότερος χώρος για την άνετη ανάπτυξη των κυττάρων μέσα στη φλάσκα, πραγματοποιείται η θρυψινοποίηση. Πριν γίνει αυτό, πρέπει να παρατηρηθεί η μορφολογία των κυττάρων και η πληρότητα της φλάσκας στο μικροσκόπιο. Ακολούθως, το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας απομακρύνεται μαζί με τα νεκρά ή γερασμένων κύτταρα με αναρρόφηση. Η διαδικασία αυτή πρέπει να γίνεται με μεγάλη προσοχή έτσι ώστε η πιπέτα Paster να μην αγγίζει την επιφάνεια της φλάσκας στην οποία βρίσκονται τα επιστρωμένα κύτταρα, με αποτέλεσμα να τα

αποκολλήσει. Στη συνέχεια, προστίθεται διάλυμα θρυψίνης/EDTA, 1ml στη φλάσκα χωρητικότητας 25cm<sup>2</sup> και 3ml θρυψίνη στη φλάσκα χωρητικότητας 75cm<sup>2</sup>. Αφού γίνει μια μικρή ανακίνηση του διαλύματος έτσι ώστε να καλύψει όλο το ταπήτιο, πραγματοποιείται επώαση των κυττάρων στους 37°C. Για να γίνει η αποκόλληση των κυττάρων από τη φλάσκα και ο μεταξύ τους διαχωρισμός, χρειάζεται γύρω στα 2,5 με 3 λεπτά και αμέσως μετά παρατηρείται το σχήμα των κυττάρων στο μικροσκόπιο. Εάν παρατηρηθεί ότι τα κύτταρα δεν έχουν αποκολληθεί, είναι πιθανόν να χρειαστούν μικρά, ελαφρά και κοφτά χτυπήματα στη φλάσκα. Αφού διαπιστωθεί πως τα κύτταρα έχουν αποκολληθεί και διαχωριστεί, προστίθεται άμεσα (για να αποφευχθεί η ενδοκυτταρική δράση του ενζύμου) ο πενταπλάσιος όγκος θρεπτικού υλικού, το οποίο περιέχει αναστολείς της θρυψίνης. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 500Xg, 5min, και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε DMEM. Μέσα στη φλάσκα, μεταφέρεται το 1/10 του διαλύματος, ενώ το υπόλοιπο απομακρύνεται και συμπληρώνεται ο υπόλοιπος όγκος με DMEM. Το διάλυμα ανακινείται ομαλά για να καταλάβει όλη την επιφάνεια της φλάσκας, η οποία μεταφέρεται στον επωαστικό κλίβανο ώστε να συνεχισθεί ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός.

#### Διατήρηση - Απόψυξη κυττάρων HepG2:

Η διατήρηση των κυττάρων για μεγάλο χρονικό διάστημα έγινε με αποθήκευση τους σε υγρό άζωτο (-196°) ή στους -80°C και ενώ βρίσκονταν σε λογαριθμική φάση. Ως κυτταροπροστατευτική ουσία χρησιμοποιήθηκε διάλυμα DMSO, το οποίο εμποδίζει την κρυστάλλωση του νερού και είναι οργανικός διαλύτης.

Η μέθοδος της συλλογής και της διατήρησης των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε άσηπτες συνθήκες (θάλαμος κάθετης νηματικής ροής αέρα, Laminar Air Flow). Αφού απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό με αναρρόφηση, προστίθεται περίπου 20% του ολικού όγκου της καλλιέργειας, διάλυμα 0,25% θρυψίνης/EDTA. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων στους 37°C και η αποκόλλησή τους μετά από 2-3 λεπτά. Για την αναστολή της δράσης της θρυψίνης γίνεται προσθήκη πενταπλάσιου όγκου θρεπτικού υλικού. Ακολουθεί συλλογή του κυτταρικού εναιωρήματος και φυγοκέντρηση στα 1000rpm για 5 λεπτά στους 25°C. Έπειτα, γίνεται επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος των κυττάρων σε 9 όγκους FBS και 1 όγκο DMSO και μοίρασμα σε πλαστικές φύσιγγες. Οι φύσιγγες μεταφέρονται απευθείας στους -80°C. Την επόμενη μέρα το απόθεμα των κυττάρων μεταφέρεται στο δοχείο υγρού αζώτου.

Η επαναφορά των κυττάρων σε θερμοκρασία καλλιέργειας απαιτεί γρήγορη απόψυξη έτσι ώστε η τήξη των κρυστάλλων να τα τραυματίσει όσο το δυνατόν

λιγότερο. Οι φύσιγγες των κυττάρων ανασύρονται από το δοχείο του υγρού αζώτου και μεταφέρονται στο υδατόλουτρο με 37°C, όπου ξεπαγώνουν με προσοχή για να αποφευχθεί η επιμόλυνση. Αφού ξεπαγώσουν τα κύτταρα, ακολουθεί μεταφορά των κυττάρων σε πλαστικό σωλήνα 15ml και γίνεται προσθήκη 9 όγκων πλήρους διαλύματος DMEM (σε 1 όγκο κυττάρων). Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στις 1000 στροφές για 5 λεπτά με σκοπό την απομάκρυνση του DMSO. Η παρουσία της κυτταροπροστατευτικής ουσίας είναι ανασταλτική του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ενώ σε μερικές περιπτώσεις δρα ως μέσο τελικής διαφοροποίησης και γι'αυτό είναι απαραίτητη η απομάκρυνσή της. Μετά την φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα εναιωρούνται σε θρεπτικό υλικό καλλιέργειας. Στη συνέχεια, μεταφέρονται σε φλάσκα αντίστοιχου όγκου και τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο για να ακολουθήσει η καλλιέργειά τους όπως περιγράφεται στις πιο πάνω παραγράφους.

#### Μέτρηση βιώσιμων κυττάρων:

Η μέτρηση των κυττάρων και κατ' επέκταση ο έλεγχος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού γίνεται με τη χρήση αιμοκυτταρόμετρου, της πλάκας Newbauer.

#### Απομόνωση μερικής καθαρότητας μιτοχονδρίων:

Για το σκοπό αυτό, γίνεται επίστρωση των κυττάρων (όμοια διαδικασία με πιο πάνω μεθόδους) σε μεγάλα πιάτα με τελικό όγκο 20 ml. Γίνεται αφαίρεση του θρεπτικού υλικού με αναρρόφηση. Ακολουθεί πλύση τους 3 φορές με 7ml (κάθε φορά) παγωμένο και αποστειρωμένο PBS 1X.

Ακολουθως, προστίθενται 800μl από το buffer ομογενοποίησης. Το buffer ομογενοποίησης έχει ωσμωμοριακότητα ίση με 300 για να διατηρηθεί η ακεραιότητα των υποκυτταρικών οργανιδίων και περιέχει αναστολείς ενζύμων έτσι ώστε όταν πραγματοποιείται η λύση των κυττάρων και απελευθερώνονται πρωτεολυτικά ένζυμα να μην καταστρέφονται οι πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα το DDT διατηρεί ανηγμένους τους δισουλφιδικούς δεσμούς και το PMSF είναι αναστολέας πρωτεολυτικών ενζύμων. Γενικά, όλοι οι αναστολείς διατηρούνται στον πάγο (4°C) καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Τα κύτταρα αποκολλούνται από την επιφάνεια του πιάτου με τη βοήθεια ειδικού ξύστρου (scraper) και συλλέγεται το κυτταρικό εναιώρημα. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με πολλή προσοχή με σκοπό τη συλλογή όσο το δυνατόν



μεγαλύτερου αριθμού κυττάρων. Έπειτα το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρεται στο δοχείο του ομογενοποιητή.

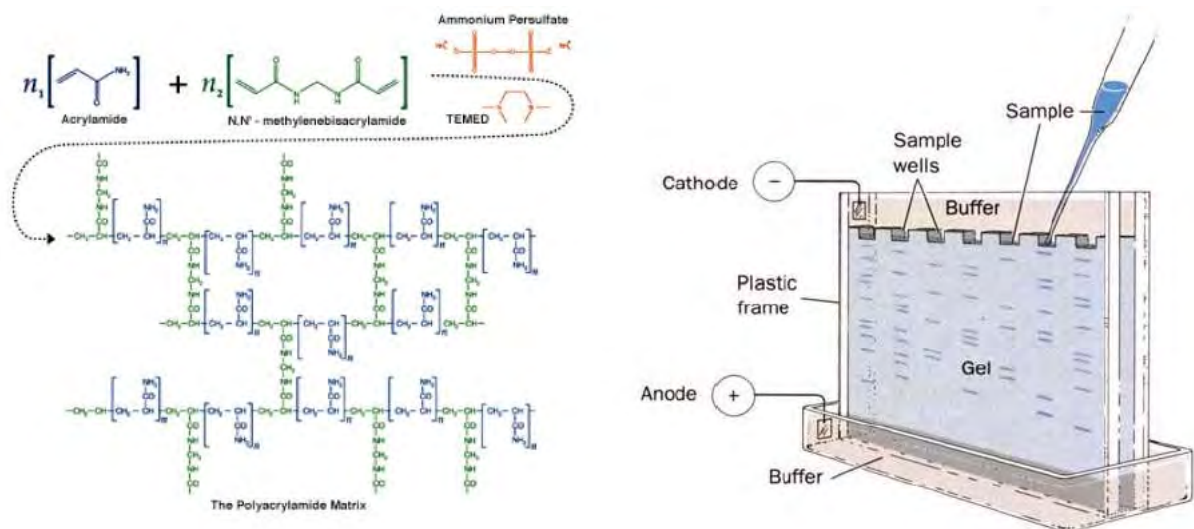
Ακολουθεί ομογενοποίηση των κυττάρων. Η διαδικασία αποτελείται από 12 και 12 φορές πάνω κάτω το δοχείο ομογενοποίησης στον ομογενοποιητή στα 2000rpm περίπου, με ενδιάμεση παύση 1 λεπτού λόγω ανάπτυξη θερμότητας.

Αφού πραγματοποιηθεί η μηχανική ομογενοποίηση-θραύση της κυτταρικής μεμβράνης, το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρεται σε falcon για τη διαδικασία της διαφορικής φυγοκέντρησης. Συγκεκριμένα, ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 3900rpm στους 4°C για 20 λεπτά, για την κατακρήμνιση των πυρήνων και ολόκληρων κυττάρων που δεν έχουν υποστεί λύση μετά την ομογενοποίηση. Έπειτα, γίνεται συλλογή του υπερκείμενου (2ml περίπου) και μοίρασμα σε 2 eppendorfs. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 10000rpm στους 4°C για 20 λεπτά, για την κατακρήμνιση υποκυτταρικών οργανιδίων όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα λυσοσώματα και τα μιτοχόνδρια. Γίνεται συλλογή του υπερκείμενου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε buffer ομογενοποίησης, αρχικά σε 100μl και ακολούθως σε 1ml. Τέλος, το ίζημα των μιτοχονδρίων φυλάσσεται στους -80°C.

### **3.2.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ (SDS-PAGE)**

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων (SDS). Ακόμα, χρησιμοποιήθηκε ασυνεχές σύστημα ρυθμιστικών διαλυμάτων (discontinuous PAGE) σύμφωνα με την μέθοδο του Laemmli (1970).

Η βασική αρχή της μεθόδου στηρίζεται στο φαινόμενο κατά το οποίο φορτισμένα μόρια και σωματίδια, μέσα σε υδάτινα διαλύματα και κάτω από την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου, κινούνται προς την κατεύθυνση του ηλεκτροδίου με το αντίθετο φορτίο. Λόγω των διαφορετικών φορτίων και μαζών, τα διάφορα μόρια θα κινηθούν με διαφορετικές ταχύτητες (διαφορετική κινητικότητα).



Εικόνα 1. Αριστερά: Σχηματισμός πηκτώματος ακρυλαμίδης. Δεξιά: Πήκτωμα επίπεδης ηλεκτροφόρησης. Διακρίνεται ο τρόπος «φόρτωσης» των δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής καθώς και η συνδεσμολογία της συσκευής. (Από <http://www.wikipedia.com/>)

Σε μία τυπική ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κυρίως με βάση τη μάζα τους. Το μίγμα των πρωτεϊνών πρώτα διαλύεται σε διάλυμα δωδεκακυλοθειικού νατρίου (SDS), ενός ανιονικού απορρυπαντικού που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τις φορτίζει αρνητικά.

Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις πρωτεΐνες σε αναλογία ένα μόριο ανά 2 αμινοξέα, δίνοντας στο σύμπλοκο ισχυρό φορτίο, περίπου ανάλογο της μάζας της πρωτεΐνης. Οι μικρές πρωτεΐνες μετακινούνται εύκολα διαμέσου του πηκτώματος ενώ οι μεγάλες μένουν στην κορυφή κοντά στο σημείο εκκίνησης (Εικ. 1, δεξιά).

Το αρχικό φορτίο της φυσικής πρωτεΐνης καθίσταται πλέον αμελητέο καθώς το αρνητικό φορτίο που αποκτάται με τη δέσμευση του SDS είναι πολύ μεγαλύτερο από το αρχικό φορτίο σε μία ευρεία κλίμακα pH. Έτσι, τα σύμπλοκα SDS-αποδιαταγμένης πρωτεΐνης ηλεκτροφορούνται με κατεύθυνση από την κάθοδο προς την άνοδο (Εικ. 1, δεξιά). Η ολοκλήρωση της ηλεκτροφορητικής διαδρομής κρίνεται από το μέτωπο του διαλύτη, το οποίο είναι έγχρωμο λόγω της χρώσης με Coomassie blue.

Το «καλούπι» στο οποίο σχηματίζεται το πήκτωμα είναι ένα «sandwich» επίπεδων τζαμιών (Εικ. 1). Το φόρτωμα των δειγμάτων γίνεται σε κατάλληλες θέσεις υποδοχής (slots) που δημιουργούνται σε πήκτωμα επίπεδης ηλεκτροφόρησης με την τοποθέτηση ειδικής «χτένας» (Εικ. 1), όσο το πήκτωμα είναι ακόμα υγρό. Η επίπεδη ηλεκτροφόρηση έχει το πλεονέκτημα ότι όλα τα δείγματα διαχωρίζονται

στο ίδιο πήκτωμα, συνεπώς στις ίδιες συνθήκες συγκέντρωσης ακρυλαμίδης, θερμοκρασίας κλπ κι έτσι είναι περισσότερο αξιόπιστη η ποιοτική και ποσοτική σύγκριση των ζωνών μεταξύ τους.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, η ηλεκτροφόρηση είναι ασυνεχής (discontinuous) επιτελείται δηλαδή σε δύο διαδοχικά πηκτώματα: ένα πήκτωμα επιστοίβασης (stacking gel) στο οποίο τοποθετούνται τα δείγματα και ένα πήκτωμα διαχωρισμού (separating ή resolving gel) το οποίο ακολουθεί ακριβώς κάτω από το πήκτωμα επιστοίβασης. Το πήκτωμα επιστοίβασης έχει μικρότερη περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδιο, ενώ το πήκτωμα διαχωρισμού είναι πιο πυκνό. Εκτός από τη διαφορά στη συγκέντρωση ακρυλαμίδιου, οι δύο τύποι πηκτής διαφέρουν και στην τιμή του pH: το πήκτωμα επιστοίβασης έχει pH περίπου 6, κοντά στο pH που έχουν και οι πρωτεΐνες.

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού του Laemmli, το πήκτωμα επιστοίβασης δε διαχωρίζει τις πρωτεΐνες αλλά τις «συμπυκνώνει» σε μία μικρή ζώνη, γεγονός που εξασφαλίζει ότι οι πρωτεΐνες κάθε δείγματος θα φθάσουν ταυτόχρονα στο κυρίως πήκτωμα διαχωρισμού. Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού, το πήκτωμα στερεώνεται κατακόρυφα στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer) τόσο στο πάνω όσο και στο κάτω μέρος της συσκευής, σε άμεση επαφή με το πήκτωμα. Ακολούθως, διαβιβάζεται ρεύμα σταθερής έντασης (γιατί χρειάζεται πολικότητα) με τη βοήθεια τροφοδοτικού, αντισταθμίζοντας τις αλλαγές που προκαλούνται από το γεγονός ότι η αντίσταση που προβάλλει το υλικό μέσα στο οποίο γίνεται η ηλεκτροφόρηση, μεταβάλλεται με το πέρασμα του χρόνου, κυρίως λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας.

#### Πρακτικό μέρος:

##### 1) Παρασκευή πηκτής ηλεκτροφόρησης.

- Πηκτή επιστοίβασης:

Το πρώτο τμήμα αποτελείται από τη πηκτή επιστοίβασης (stacking gel), όπου τα δείγματα πακετάρονται με σταθερή τάση 100V και έχει σταθερό ποσοστό ακρυλαμίδης 4%.

Σύσταση πηκτής επιστοίβασης:

Αντιδραστήρια	Τελική συγκέντρωση
Ακρυλαμίδιο 40%	4 %
Tris-HCl 1,5M (pH6,8)	0,125M
SDS 10%	0,1%
TEMED	0,1%
APS 10%	0,05%

- Πηκτή διαχωρισμού:

Το ποσοστό ακρυλαμιδίου της πηκτής διαχωρισμού (separating gel) εξαρτάται από το μοριακό μέγεθος των πρωτεϊνών που επιθυμούμε να ηλεκτροφορήσουμε. Για τα συγκεκριμένα πειράματα, χρησιμοποιήσαμε 7,5% ποσοστό ακρυλαμιδίου, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός μεγαλομοριακών πρωτεϊνών, ενώ οι μικρομοριακές πρωτεΐνες απορρίπτονται γρήγορα.

Σύσταση πηκτής διαχωρισμού:

Αντιδραστήρια	Τελική συγκέντρωση
Ακρυλαμίδιο 40%	7,5%-12%
Tris-HCl 1,5M (pH8,8)	0,375M
SDS 10%	0,1%
TEMED	0,05%
APS 10%	0,05%
ddH <sub>2</sub> O	-

Το APS (Ammonium Persulfate: υπερθειϊκό αμμώνιο-απαρχητής του πολυμερισμού) και το TEMED (N, N,-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη-επιταχυντής του πολυμερισμού) προστίθενται στο τέλος καθώς είναι υπεύθυνα για την επιτάχυνση του πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου. Το APS δημιουργεί ελεύθερες ρίζες για πολυμερισμό ενώ ο επιταχυντής καταλύει τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου.

Καλό είναι να αποφεύγεται η επαφή του διαλύματος της ακρυλαμίδης με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο γιατί υπάρχει κίνδυνος οξείδωσης του TEMED κι έτσι παρεμπόδισης του πολυμερισμού. Πρέπει, επίσης, να αποφευχθεί η έκθεση του ακρυλαμιδίου στο φως γιατί το αλλοιώνει.

## 2) Προετοιμασία δείγματος ηλεκτροφόρησης.

Το μίγμα των πρωτεϊνών πρώτα διαλύεται σε διάλυμα δωδεκακυλοθειικού νατρίου (SDS), ενός ανιονικού απορρυπαντικού που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τις φορτίζει αρνητικά. Προστίθεται επίσης μερκαπτοαιθανόλη ή διθειοθρεϊτόλη, που ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς, οι οποίοι αναπτύσσονται ανάμεσα σε δύο ομάδες -SH κυστεϊνών της ίδιας ή δύο διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων και η αποδιάταξη ολοκληρώνεται με θέρμανση στους 95°C για 3 λεπτά έτσι ώστε να γίνεται μετουσίωση των πρωτεϊνών. Το ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (loading buffer 4x) περιλαμβάνει:

- 1M Tris pH 6.8
- 10% glycerol
- 10% SDS
- 5% β-μερκαπτοαιθανόλη
- 1% bromophenol blue.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση του δείγματος για 15 λεπτά, λόγω δημιουργίας υδρατμών, για να μην χαθούν ποσότητες δείγματος.

## 3) Φόρτωμα και τρέξιμο δείγματος.

Αρχικά, συναρμολογείται η συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπως φαίνεται στην Εικ.1. Ακολούθως φορτώνονται 30-50μg πρωτεΐνης στις ειδικές αύλακες της πηκτής καθώς και οι έγχρωμοι μάρτυρες μοριακού βάρους. Έπειτα, προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer), έτσι ώστε να έρχεται σε επαφή με την πηκτή. Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (running buffer) είναι η εξής:

- 25mM Tris
- 192 mM Glycine
- 10% SDS

Τέλος, συνδέονται τα ηλεκτρόδια με την συσκευή τροφοδότησης και εφαρμόζεται τάση 100V, μέχρι τα δείγματα να διανύσουν την πηκτή επιστοίβασης, ενώ μόλις φτάσουν στη πηκτή διαχωρισμού η τάση αυξάνεται στα 120V.

### 3.2.3 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ WESTERN (Western Blot)

Η ανοσοαποτύπωση Western είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική ανάλυσης, η οποία πραγματοποιείται για την ανίχνευση και ταυτοποίηση συγκεκριμένων πρωτεϊνών από ένα δείγμα ομογενοποιημένου ιστού ή εκχύλισμα. Αρχικά, οι πρωτεΐνες του δείγματος ηλεκτροφορούνται σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδιου. Ακολούθως, μεταφέρονται σε μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, όπου ανιχνεύονται με τη χρήση συγκεκριμένων αντισωμάτων και εμφανίζεται σήμα.

Με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης, επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Δηλαδή, οι πρωτεΐνες μεγάλου μεγέθους έχουν μειωμένη κινητικότητα ενώ η κίνηση μέσα στο πήκτωμα είναι ταχύτερη για τις πρωτεΐνες μικρότερου μεγέθους. Αφού διαχωριστούν, πραγματοποιείται η αποτύπωση του πηκτώματος στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης με τη μέθοδο της ηλεκτρομεταφοράς, εφαρμόζοντας διαφορά δυναμικού. Για να εμφανιστεί το σήμα, γίνεται επώαση με το ειδικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης υπό μελέτη, αφού οι πρωτεΐνες διατηρούν τις αντιγονικές τους ιδιότητες και μετά τη μεταφορά τους στη μεμβράνη. Το αντίσωμα δεσμεύεται στη μεμβράνη και μετά από μια διαδικασία πλύσεων της μεμβράνης με διάφορα διαλύματα, γίνεται επώαση και με το δεύτερο αντίσωμα, το οποίο είναι αντίσωμα έναντι του ζώου από το οποίο παράχθηκε το πρώτο αντίσωμα, το οποίο είναι σημασμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση (HRP - horseradish peroxidase), και ως εκ τούτου προσδένεται στο πρώτο.

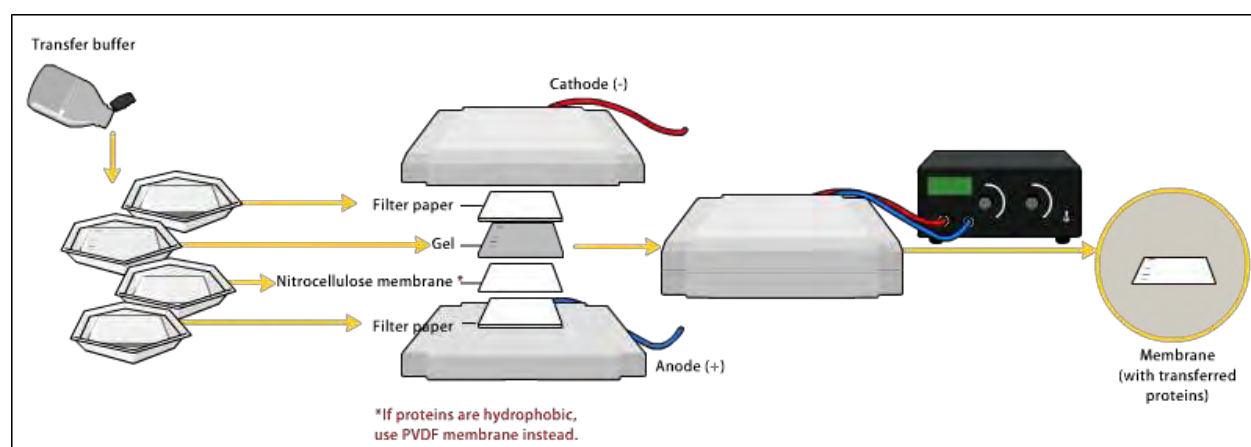
#### Πρακτικό μέρος:

Πριν από τη πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης και της ανοσοαποτύπωσης Western, είναι απαραίτητο να υπολογιστεί η συγκέντρωση των πρωτεϊνών σε mg του προς ανάλυση δείγματος.

Αυτό πραγματοποιείται για να υπολογιστεί ο όγκος από το δείγμα αφού η επιθυμητή συγκέντρωση της πρωτεΐνης ανά πηγαδάκι καθορίζεται στα 30mg.

Στη συνέχεια, διαχωρίζονται οι πρωτεΐνες με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή 7,5% ή 12% SDS-PAGE. Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, η πηκτή επωάζεται στο transfer buffer για 15 λεπτά, καθώς και τα σφουγγαράκια και τα χαρτιά Wattman 3mm που θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια. Ακολούθως, συναρμολογείται η συσκευή για τη μεταφορά. Η διάταξη μέσα στην κασέτα

μεταφοράς είναι η ακόλουθη: σφουγγάρι – 2 χαρτιά Wattman- πηκτή- μεμβράνη νιτροκυτταρίνης- 2 χαρτιά Wattman- σφουγγάρι.



Εικόνα 2. Διαμόρφωση κασέτας μεταφοράς. (Από <http://www.wikipedia.com/>)

Η μεμβράνη πρέπει να είναι τοποθετημένη με προσανατολισμό στο θετικό πόλο, ενώ η πηκτή προς τον αρνητικό, έτσι ώστε η ροή του ρεύματος να μεταφέρει τις πρωτεΐνες προς τη μεμβράνη. Η διαδικασία της μεταφοράς έχει διάρκεια 70 λεπτών στα 0,35A. Με το πέρας των 70 λεπτών, ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με 10 ml Blocking Buffer για 1 ώρα υπό ελαφριά ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Η επώαση με το Blocking Buffer γίνεται για να κορεστεί η μεμβράνη από τις πρωτεΐνες του γάλακτος στις μη-ειδικές θέσεις, έτσι ώστε το αντίσωμα που θα προστεθεί στη συνέχεια να δεσμεύεται μόνο στην αντίστοιχη πρωτεΐνη για την οποία προστίθεται, μόνο στις ειδικές θέσεις. Στη συνέχεια ακολουθεί η τοποθέτηση της μεμβράνης σε λεκάνη με PBST, για να πραγματοποιηθεί πλύση.

Το επόμενο στάδιο είναι η επώαση της μεμβράνης για όλο το βράδυ με πρωτογενή αντισώματα στους 4°C. Συγκεκριμένα, η μεμβράνη τεμαχίζεται σε 3 μέρη, όπου το καθένα επωάζεται με ξεχωριστό είδος αντίσωμα το καθένα: το αντι-GR και τα αντισώματα έναντι του μιτοχονδριακού μεταγραφικού παράγοντα TFAM (against C-terminal και against middle region). Η επώαση του κάθε μέρους της μεμβράνης γίνεται με τη βοήθεια του σακουλοποιητή που διαμορφώνει ένα αεροστεγές περιβάλλον για την δέσμευση του αντισώματος.

Ακολουθώντας, η μεμβράνη εκπλένεται 3 φορές σε PBST για 5 λεπτά σε αναδευτήρα, με σκοπό να απομακρυνθεί το πρωτογενές αντίσωμα το οποίο δεν προσδέθηκε στη μεμβράνη. Έπειτα, ακολουθεί η επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα σε αραιώση 1:50000 για  $1^{1/2}$  ώρα υπό ήπια ανάδευση. Το δευτερογενές αντίσωμα φέρει ομοιοπολικά προσδεμένο το ένζυμο υπεροξειδάση, το οποίο είναι υπεύθυνο για το σήμα στο τέλος της διαδικασίας, που δείχνει το σημείο στο οποίο βρίσκεται η επιθυμητή πρωτεΐνη. Τέλος, η μεμβράνη ξεπλένεται 3 φορές με PBST για 10 λεπτά και ακολουθεί η εμφάνιση του σήματος με κατάλληλο υπόστρωμα για το δευτερογενές αντίσωμα.

Για την εμφάνιση του σήματος αρχικά χρησιμοποιείται το πρωτόκολλο του kit της CHEMICON. Αυτό το kit περιλαμβάνει το Luminol/Enhancer διάλυμα (διάλυμα αντίδρασης/ενίσχυσης σήματος), το διάλυμα υπεροξειδίου και το διάλυμα διαλυτοποίησης υπεροξειδίου, ώστε να υπάρξει εμφάνιση σήματος σε film στη συνέχεια. Ειδικότερα, προετοιμάζεται 1:1000 αραιώση, του διαλύματος αραιώσης του υπεροξειδίου με το διάλυμα υπεροξειδίου και στη συνέχεια, ενοποιούνται τα διαλύματα αντίδρασης/ενίσχυσης σήματος και διάλυμα υπεροξειδίου. Αυτό το ενοποιημένο διάλυμα είναι λειτουργικό για αρκετές ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, αυτό τοποθετείται στη μεμβράνη για 3 λεπτά, σε σημείο που να μην εκτίθεται στο φως, και μετά χωρίς να ξεπλυθεί η μεμβράνη τοποθετείται στην ειδική κασέτα.

Στη συνέχεια, τοποθετούνται στην κασέτα τα film στα οποία εμφανίζεται εντέλει το σήμα. Για την εμφάνιση των film χρησιμοποιείται το πρωτόκολλο του kit της Kodak το οποίο περιλαμβάνει το διάλυμα developer και το διάλυμα fixer. Το film μετά την έκθεση του στη μεμβράνη (για όσο χρονικό διάστημα είναι επιθυμητό, το οποίο εξαρτάται από το πείραμα) τοποθετείται για 1 λεπτό στο διάλυμα developer και αφού ξεπλυθεί με νερό στιγμιαία, έπειτα τοποθετείται για 30 δευτερόλεπτα στο διάλυμα fixer. Τέλος, ακολουθεί νέο στιγμιαίο ξέπλυμα του film. Έτσι, το σήμα εμφανίζεται στο film και πλέον μπορεί να μελετηθεί. Αξίζει να σημειωθεί ότι όλη η διαδικασία εμφάνισης του film πρέπει να γίνεται σε σκοτεινό δωμάτιο ώστε να μην υπάρχει καταστροφή/κάψιμο των film.



### 3.2.4 ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ [Immunoprecipitation (IP)] ΣΕ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ HepG2 ΜΕ ΧΡΗΣΗ Protein-A beads

Η διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης γίνεται σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων HepG2 με χρήση protein-A agarosebeads (σφαιρίδια αγαρόζης σημασμένα με πρωτεΐνη A). Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τον καθαρισμό μιας πρωτεΐνης. Ένα αντίσωμα για την υπό μελέτη πρωτεΐνη επωάζεται με το εκχύλισμα των κυττάρων έτσι ώστε το αντίσωμα να προσδεθεί στην πρωτεΐνη στο διάλυμα. Το σύμπλοκο αντισώματος/αντιγόνου μπορεί να απομονωθεί από το δείγμα με τη χρήση σφαιριδίων αγαρόζης σημασμένων με πρωτεΐνη A/G. Αυτό συνήθως οδηγεί στην απομόνωση της υπό μελέτη πρωτεΐνης από το υπόλοιπο δείγμα. Τέλος, πραγματοποιείται διαχωρισμός του δείγματος με SDS-PAGE για την ανοσοαποτύπωση Western.

#### Πρακτικό μέρος:

Για τη διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης κατασκευάζεται μια μικρο-στήλη χρωματογραφίας με σφαιρίδια αγαρόζης τα οποία είναι σημασμένα με πρωτεΐνη A ή G (ανάλογα με τον τύπο Ig του αντισώματος). Η πρωτεΐνη A έχει την ικανότητα να δένεται με το αντίσωμα έναντι του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, είτε έναντι του υπό μελέτη μορίου, το οποίο στην περίπτωση μας προσδένεται με τον υποδοχέα, λόγω της χημικής συγγένειας αντιγόνου αντισώματος. Με τη διαδικασία αυτή στην στήλη βρίσκεται αγκυροβολημένο το αντίσωμα και ακολουθεί η προσθήκη του εκχυλίσματος και η δέσμευση της πρωτεΐνης υπό μελέτη.

Το πρώτο στάδιο αποτελείται από την κατασκευή της στήλης με τα σφαιρίδια. Για κάθε αντίσωμα που θα ελεγχθεί, χρειάζονται 30μl σφαιριδίων. Τα σφαιρίδια πρέπει πάντα να φυλάσσονται σε διάλυμα έτσι ώστε να μη στεγνώνουν. Για το λόγο αυτό φυλάσσονται σε επιπλέον μισό όγκο αιθανόλης. Λόγω της επώασης με διαφόρων τύπων αντισωμάτων γίνεται χρήση μείγματος πρωτεΐνης A και πρωτεΐνης G. Αρχικά, η αιθανόλη απομακρύνεται με φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στα 2000rpm. Ακολούθως η στήλη εξισορροπείται με έκπλυση με RIPA buffer το οποίο προκαλεί λύση των κυττάρων αλλά όχι των συνδέσεων μεταξύ των μορίων. Η διαδικασία των πλύσεων με 1ml RIPA buffer επαναλαμβάνεται τρεις φορές και αποτελείται από ήπια ανάδευση για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στα 2000rpm.

Μετά από τις εκπλύσεις με RIPA buffer, το υπερκείμενο απορρίπτεται για την απομάκρυνση της αιθανόλης και του RIPA. Έπειτα, γίνεται προσθήκη κατάλληλου όγκου αντισωμάτων. Τα αντισώματα αυτά είναι το 2F8 και το H300. Τα σφαιρίδια επωάζονται με τα αντισώματα για 4 ώρες, υπό ανάδευση, στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και ακολουθούν 3 εκπλύσεις με 1ml RIPA, με ανάδευση για 5 λεπτά και φυγοκέντρωση για 3 λεπτά στις 2000rpm, στους 4°C.

Ακολουθεί η προετοιμασία του εκχυλίσματος με τα κύτταρα. Χρησιμοποιούνται κύτταρα HepG2 που μεγαλώνουν σε 15cm πιάτα με DMEM. Στο διάλυμα προστίθενται επίσης 6ml DDT για τους σουλφιδικούς δεσμούς, PMSF για καλή διαλυτοποίηση, 3ml RIPA και 30ml αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών. Το σύνολο των πιο πάνω διαλυμάτων αποτελεί το Lysis Buffer. Στη συνέχεια, τα κύτταρα ομογενοποιούνται με το μηχάνημα υπερήχων 4 φορές για 20 δευτερόλεπτα. Το δείγμα διατηρείται στον πάγο κατά τη διαδικασία της λύσης για να μην αναπτυχθεί θερμότητα και καταστραφούν οι πρωτεΐνες. Στη συνέχεια, φυγοκεντρείται για 30min στις 14000 rpm, φυγοκεντρείται για κατακρήμνιση των μεμβρανικών συστατικών και συλλέγεται το υπερκείμενο.

Ποσότητα σφαιριδίων αгарόξης σημασμένων με πρωτεΐνη A και το υπερκείμενο των κυττάρων αναμειγνύονται για να αποκλειστεί η μη ειδική σύνδεση συστατικών του εκχυλίσματος των κυττάρων με τα σφαιρίδια. Ακολουθεί επώαση για 2 ώρες, υπό ανάδευση, στους 4°C. Μετά την επώαση φυγοκεντρούνται για 15 λεπτά, στις 14000rpm για την απομάκρυνση των μη ειδικών συνδέσεων. Το υπερκείμενο (υπερκείμενο που έχει υποστεί προ-καθαρισμό, pre-clearance) συλλέγεται και διαμοιράζεται στα σφαιρίδια που έχουν προεπωαστεί με τα αντισώματα για. Ακολουθεί ανάδευση σε 160 rpm, για 16 ώρες, στους 4°C.

Με την ολοκλήρωση της επώασης των 16 ωρών, ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρωση για 5 λεπτά, στις 2000rpm, στους 4°C. Ακολουθούν 5 εκπλύσεις του ιζήματος (το προκύπτον υπερκείμενο απορρίπτεται) με 1ml RIPA, συνοδευόμενες από ανάδευση για 10 λεπτά και φυγοκέντρωση για 5 λεπτά, στις 2000rpm, στους 4°C. Το ίζημα της τελευταίας έκπλυσης επαναδιαλυτοποιείται με vortex σε 25μl

Sample Buffer x2. Ακολουθεί θέρμανση των διαλυμάτων σε θερμαντική πλάκα (dry heat block bath), για 5 λεπτά, στους 95°C και φυγοκέντρωση για 5 λεπτά, στις 2000rpm, στους 4°C. Το ίζημα διαλυτοποιείται σύμφωνα με το προηγούμενο βήμα. Το υπερκείμενο από τα δύο βήματα, όπως και το τελικά ίζημα των σφαιριδίων φυλάσσονται στους -20°C.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στα δείγματα με το εκχύλισμα των κυττάρων, πραγματοποιείται η μέθοδος Bradford, με φωτομέτρηση των διαλυμάτων στα 595nm.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου και ακολούθως ανοσοαποτύπωση Western.

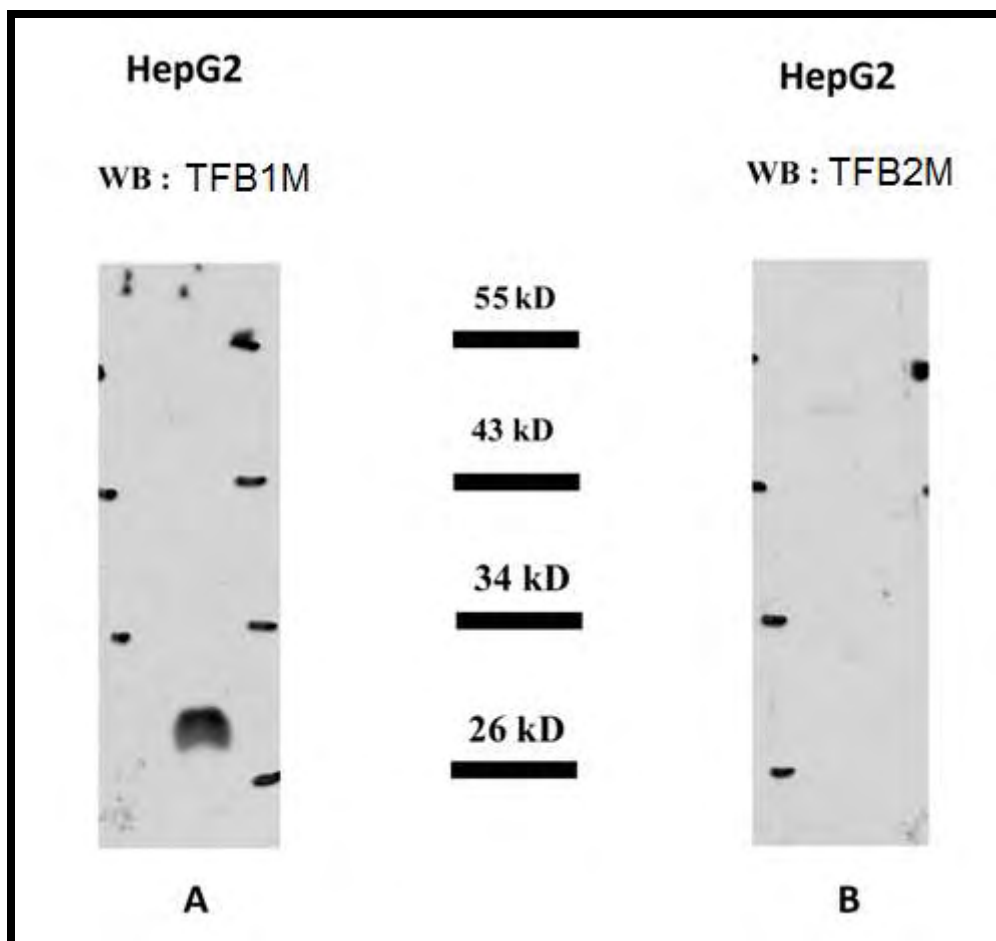
## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### **4.1 Έλεγχος αντισωμάτων έναντι μεταγραφικών παραγόντων TFB1M και TFB2M.**

Ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας των αντισωμάτων έναντι των μεταγραφικών παραγόντων TFB1M και TFB2M, πραγματοποιήθηκε με την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών από ολικό εκχύλισμα κυττάρων HepG2 σε gel πολυακρυλαμίδης, στη συνέχεια, ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών του gel σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και επώαση τους με αντισώματα έναντι αυτών. Η εμφάνιση του σήματος της ανοσοαποτύπωσης φαίνεται στην ακόλουθη εικόνα.

Ημερομηνία: 11/5/2012

Κύτταρα: HepG2 P93 (Ολικό εκχύλισμα)



(A) Προϊόν ανοσοαποτύπωσης TFB1M από εκχύλισμα κυττάρων HepG2 με χρήση αντισώματος έναντι του TFB1M. (B) Προϊόν ανοσοαποτύπωσης TFB2M από εκχύλισμα κυττάρων HepG2 με χρήση αντισώματος έναντι του TFB2M.

Στο ολικό εκχύλισμα κυττάρων ηπατοκαρκινώματος, με τη χρήση αντισώματος έναντι του μεταγραφικού παράγοντα TFB1M, εντοπίστηκε μια μπάντα στο μοριακό

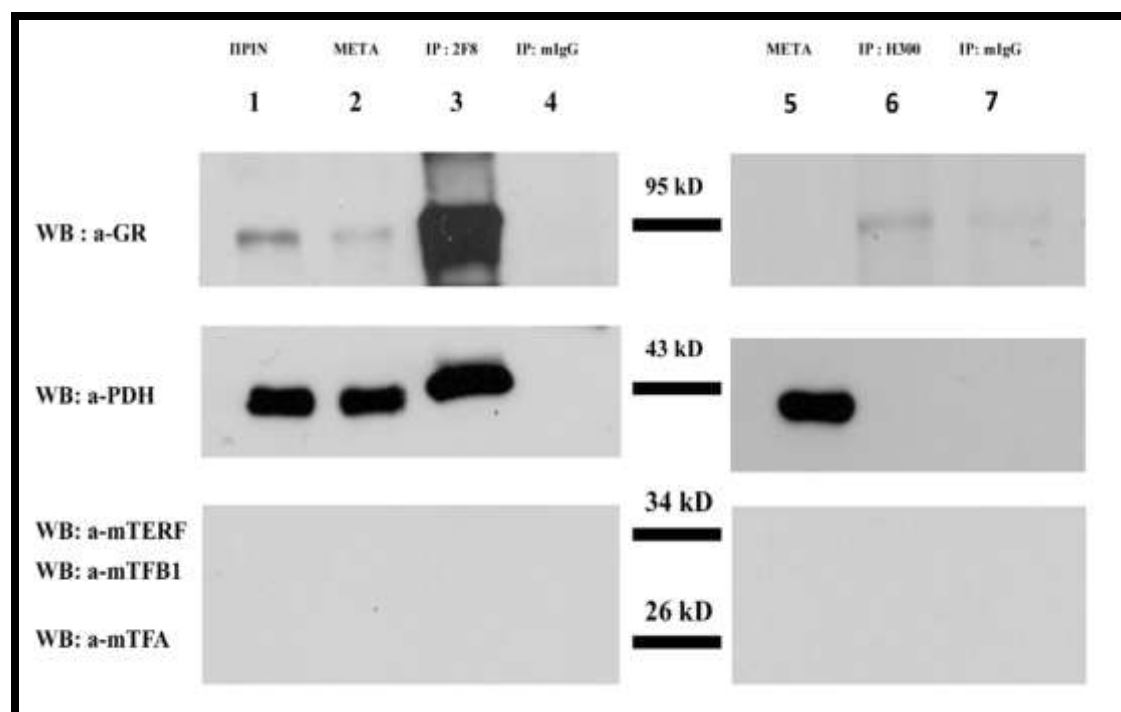
μέγεθος που αντιστοιχεί σε αυτό του TFB1M, αποτέλεσμα της ανίχνευσης του TFB1M στο εκχύλισμα των κυττάρων. Η ανίχνευση του TFB2M δεν κατέσται δυνατή με χρήση του αντίστοιχου αντισώματος.

#### 4.2. Έλεγχος της αλληλεπίδρασης του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με μιτοχονδριακούς μεταγραφικούς παράγοντες και PDH σε ολικό εκχύλισμα κυττάρων HepG2.

Ο έλεγχος της αλληλεπίδρασης του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με τους μεταγραφικούς παράγοντες mTFA, TFB1M, TFB2M mTERF καθώς και η αλληλεπίδρασή του με το μιτοχονδριακό ένζυμο PDH, πραγματοποιήθηκε αρχικά με την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών εκχυλίσματος κυττάρων HepG2, που συν-ανοσοκατακρημνισθέντων σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης με χρήση πολυκλωνικού (GR-H300) και μονοκλωνικού αντισώματος (GR-2F8) έναντι του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Στη συνέχεια, η ανίχνευση των πιθανών ανοσοκατακρημνισθέντων πρωτεϊνών έγινε με χρήση ειδικών αντισωμάτων μετα την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών του gel σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Τα αποτελέσματα της ανίχνευσης του σήματος της ανοσοαποτύπωσης φαίνονται στην ακόλουθη εικόνα.

Ημερομηνία: 30/4/2012

Κύτταρα: HepG2 P93 (Ολικό εκχύλισμα)



(1) Εκχύλισμα κυττάρων HepG2 πριν την ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα (GR-2F8) έναντι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. (2) Εκχύλισμα κυττάρων HepG2 μετά

την ανοσοκατακρήμνιση με το 2F8 αντίσωμα έναντι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. (3) Προϊόν ανοσοκατακρήμνισης εκχυλίσματος κυττάρων HepG2 με αντίσωμα έναντι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR-2F8). (4) Προϊόν ανοσοκατακρήμνισης εκχυλίσματος κυττάρων HepG2 με αντισώματα mIgG. (5) Εκχύλισμα κυττάρων HepG2 μετά την ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα έναντι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR-H300). (6) Προϊόν ανοσοκατακρήμνισης εκχυλίσματος κυττάρων HepG2 με αντίσωμα έναντι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR-H300). (7) Προϊόν ανοσοκατακρήμνισης εκχυλίσματος κυττάρων HepG2 με αντισώματα mIgG.

Σύμφωνα με το σήμα που εμφανίστηκε κατά τη διάρκεια του παραπάνω πειράματος ανοσοαποτύπωσης, αρχικά παρατηρήθηκε, όπως αναμενόταν, ότι τα κύτταρα ηπατοκαρκινώματος, HepG2, εκφράζουν τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Το συμπέρασμα αυτό προέρχεται από τη διαπίστωση ότι με τη χρήση του αντισώματος H300 έναντι του GR, σε πείραμα ανοσοαποτύπωσης, ανιχνεύονται μόρια GR που εντοπίζονται στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα τόσο πριν και μετά την ανοσοκατακρήμνιση του GR με το αντίσωμα 2F8, όσο και στο ανοσοκατακρημνισθέν σύμπλοκο GR και αντίστοιχων αντισωμάτων. Ο υποδοχέας όπως αναμενόταν εμφανίζεται ως μία πρωτεϊνική ζώνη, μοριακού βάρους 95kDa. Η επιτυχία της ανοσοκατακρήμνισης με χρήση του αντισώματος 2F8 υποδηλώνεται επίσης από το γεγονός ότι η ένταση της πρωτεϊνικής ζώνης του GR μετά την ανοσοκατακρήμνιση εμφανίζεται μικρότερη αυτής μετά την ανοσοκατακρήμνιση.

Με τη χρήση αντισώματος έναντι του ενζύμου PDH παρατηρήθηκε ότι η PDH είναι παρόν στο αρχικό εκχύλισμα των κυττάρων πριν και μετά την ανοσοκατακρήμνιση, με μικρότερα επίπεδα έκφρασης μετά την ανοσοκατακρήμνιση γεγονός που υποδηλώνει τη δέσμευση του υπολειπόμενου ποσού PDH από τον GR. Γεγονός που επιβεβαιώνεται από την ανίχνευση PDH στη διαδρομή όπου ηλεκτροφορούνται οι συν-ανοσοκρημνισθέντες πρωτεΐνες του συμπλόκου GR-2F8, υποδηλώνοντας έτσι τη δυνατότητα αλληλεπίδρασης GR και PDH στο μιτοχονδριακό περιβάλλον. Η PDH αποτελεί ένα βασικό ένζυμο του μιτοχονδριακού μεταβολισμού, το οποίο αφθονεί σε ποσότητα στο υποκυτταρικό αυτό διαμέρισμα όπως αποδεικνύεται και από την ένταση του σήματος. Η χρήση του GR-H300 αντισώματος δεν επέτρεψε την επαλήθευση της παρατήρησης της αλληλεπίδρασης GR και PDH.

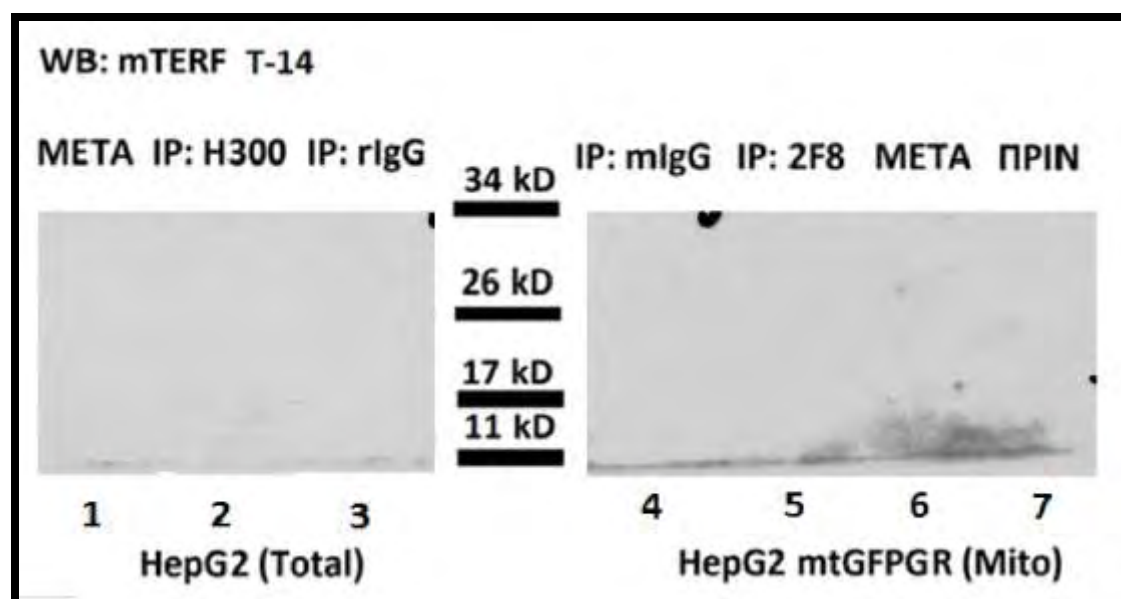
Με τη χρήση αντισωμάτων έναντι των μεταγραφικών παραγόντων TFB1M, TFB2M, mTFA και mTERF, δεν ανιχνεύθηκε οποιαδήποτε μπάντα, γεγονός που δηλώνει είτε την απουσία των συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων από το σύμπλοκο συν-ανοσοκατακρήμνισης είτε την αδυναμία των αντισωμάτων να τους ανιχνεύσουν όπως υποδηλώνεται από την απουσία ανίχνευσης τους στις πρωτεϊνικές διαδρομές πριν και μετά την ανοσοκατακρήμνιση. Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες έχουν λειτουργικό και όχι δομικό ρόλο στη μεταγραφική διαδικασία, γεγονός που αντιστοιχεί στη μικρή ποσότητα εντόπισής τους στο μιτοχονδριακό περιβάλλον.

#### 4.3 Έλεγχος της αλληλεπίδρασης του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με μιτοχονδριακούς μεταγραφικούς παράγοντες και PDH σε ολικό εκχύλισμα κυττάρων HepG2 και απομονωμένα μιτοχόνδρια κυττάρων HepG2 mtGFPGR.

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της αλληλεπίδρασης του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με τους μεταγραφικούς mTERF και mTFA, καθώς και με το ένζυμο PDH: α) μετά την ανοσοκατακρήμνιση του GR με το αντίσωμα GR-H300 και χρήση διπλάσιας ποσότητας εκχυλίσματος κυττάρων HepG2 σε σχέση με αυτό της δοκιμασίας 4.1 αλλά και β) χρήση του αντισώματος GR-2F8 για την ανοσοκατακρήμνιση του υποδοχέα από εκχύλισμα απομονωμένων μιτοχονδρίων από κύτταρα HepG2 που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, (HepG2 mtGFPGR). Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε gel πολυακρυλαμίδης, ακολούθησε ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών του gel σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και επώαση της με αντισώματα έναντι αυτών. Η εμφάνιση του σήματος της ανοσοαποτύπωσης φαίνεται στην ακόλουθη εικόνα.

Ημερομηνία: 23/5/2012

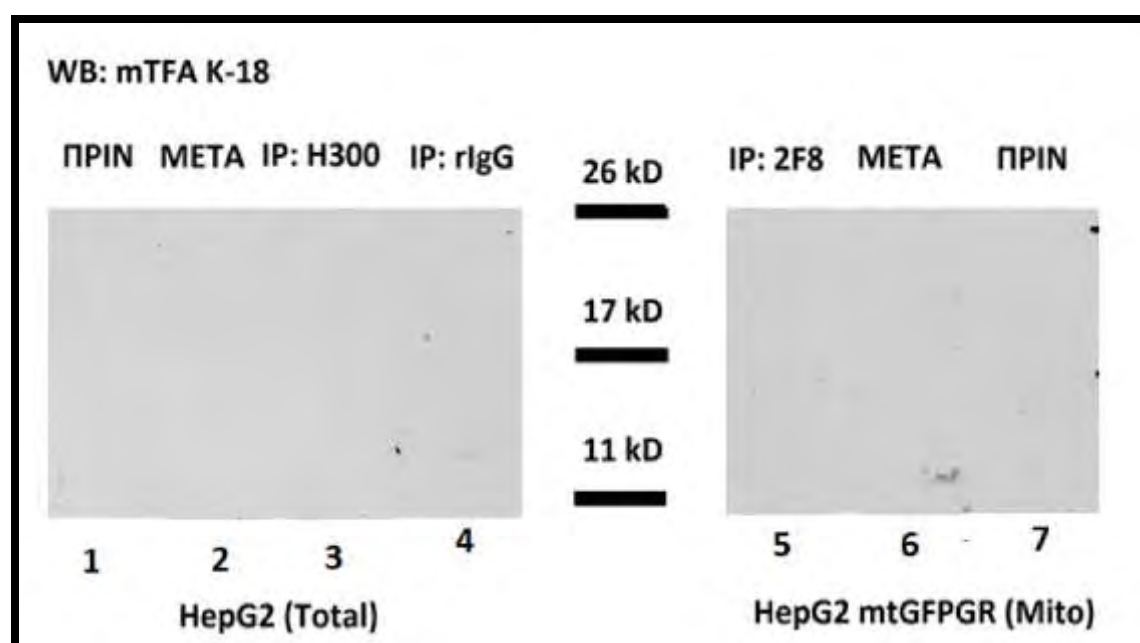
Κύτταρα: HepG2 P94 (Total), HepG2 mtGFPGR C2



(1) Εκχύλισμα κυττάρων HepG2 μετά την ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα έναντι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR-H300). (2) Προϊόν ανοσοκατακρήμνισης εκχυλίσματος κυττάρων HepG2 με αντίσωμα έναντι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR-H300). (3) Προϊόν ανοσοκατακρήμνισης εκχυλίσματος κυττάρων HepG2 με αντισώματα rIgG. (4) Προϊόν ανοσοκατακρήμνισης μιτοχονδριακού εκχυλίσματος κυττάρων HepG2 mtGFPGR με αντισώματα mIgG. (5) Προϊόν ανοσοκατακρήμνισης μιτοχονδριακού εκχυλίσματος κυττάρων HepG2 mtGFPGR με αντίσωμα έναντι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR-2F8). (6) Μιτοχονδριακό εκχύλισμα κυττάρων HepG2 mtGFPGR μετά την ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα έναντι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR-2F8).

(7)Μιτοχονδριακό εκχύλισμα κυττάρων HepG2 mtGFPGR πριν την ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα έναντι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR-2F8).

Με τη χρήση αντισώματος έναντι του μιτοχονδριακού παράγοντα mTERF τόσο σε ολικό εκχύλισμα κυττάρων ηπατοκαρκινώματος HepG2, όσο και σε μιτοχονδριακό εκχύλισμα κυττάρων ηπατοκαρκινώματος HepG2, που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με μιτοχονδριακή στόχευσης, δεν ανιχνεύθηκε σήμα το οποίο να αντιστοιχεί σε προϊόν συν-ανοσοκατακρήμνισης του υποδοχέα με το mTERF. Ο μιτοχονδριακός παράγοντας mTERF δεν ανιχνεύτηκε ούτε στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα πριν και μετά την ανοσοκατακρήμνιση.



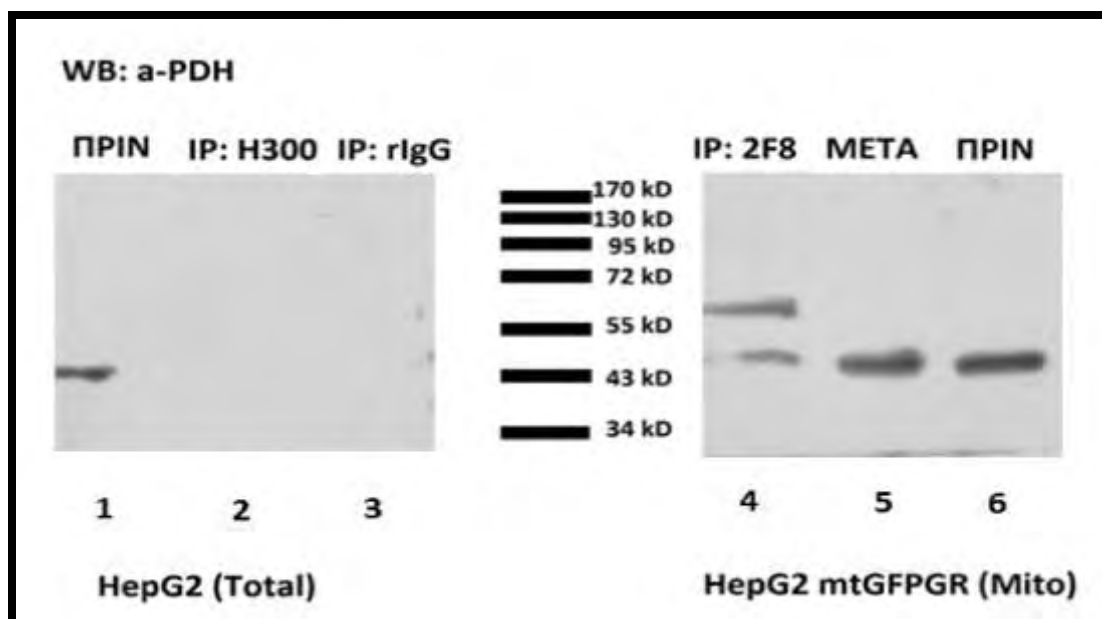
(1) Εκχύλισμα κυττάρων HepG2 πριν την ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα έναντι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. (2) Εκχύλισμα κυττάρων HepG2 μετά την ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα έναντι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. (3) Προϊόν ανοσοκατακρήμνισης εκχυλίσματος κυττάρων HepG2 με αντίσωμα έναντι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR-H300). (4) Προϊόν ανοσοκατακρήμνισης εκχυλίσματος κυττάρων HepG2 με αντισώματα rIgG. (5) Προϊόν ανοσοκατακρήμνισης μιτοχονδριακού εκχυλίσματος κυττάρων HepG2 mtGFPGR με αντίσωμα έναντι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR-2F8). (6) Μιτοχονδριακό εκχύλισμα κυττάρων HepG2 mtGFPGR μετά την ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα έναντι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. (7) Μιτοχονδριακό εκχύλισμα κυττάρων HepG2 mtGFPGR πριν την ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα έναντι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.

Με τη χρήση αντισώματος έναντι του μιτοχονδριακού παράγοντα mTFA τόσο σε ολικό εκχύλισμα κυττάρων ηπατοκαρκινώματος HepG2, όσο και σε μιτοχονδριακό εκχύλισμα κυττάρων ηπατοκαρκινώματος HepG2, που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με μιτοχονδριακή στόχευσης, δεν ανιχνεύθηκε σήμα



το οποίο να αντιστοιχεί σε προϊόν συν-ανοσοκατακρήμνισης του υποδοχέα με το mTAF. Ο μιτοχονδριακός παράγοντας mTFA δεν ανιχνεύτηκε ούτε στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα πριν και μετά την ανοσοκατακρήμνιση.

Όπως προαναφέρθηκε για τους μιτοχονδριακούς παράγοντες, πρόκειται για μόρια με καθαρά λειτουργικό και όχι δομικό ρόλο, συνεπώς η μικρή τους ποσότητα στο μιτοχόνδριο αποτελεί περιοριστικό παράγοντα στην ανίχνευση τους ιδιαίτερα ως προϊόν ανοσοκατακρήμνισης τους με ένα άλλο μόριο όπως τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών που επίσης δεν αφθονεί στο μιτοχονδριακό περιβάλλον.



(1) Εκχύλισμα κυττάρων HepG2 πριν την ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα έναντι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. (2) Προϊόν ανοσοκατακρήμνισης εκχυλίσματος κυττάρων HepG2 με αντίσωμα έναντι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR-H300). (3) Προϊόν ανοσοκατακρήμνισης εκχυλίσματος κυττάρων HepG2 με αντισώματα rIgG. (4) Προϊόν ανοσοκατακρήμνισης μιτοχονδριακού εκχυλίσματος κυττάρων HepG2 mtGFPGR με αντίσωμα έναντι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR-2F8). (5) Μιτοχονδριακό εκχύλισμα κυττάρων HepG2 mtGFPGR μετά την ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα έναντι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. (6) Μιτοχονδριακό εκχύλισμα κυττάρων HepG2 mtGFPGR πριν την ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα έναντι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.

Αναφορικά με την ανίχνευση της συν-ανοσοκατακρήμνισης της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού (PDH) με τον GR με χρήση κατάλληλου αντισώματος, παρατηρούμε αλληλεπίδραση του GR με τη PDH σε μιτοχονδριακό εκχύλισμα κυττάρων ηπατοκαρκινώματος HepG2, που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με μιτοχονδριακή στόχευση. Όπως αναμενόταν παρατηρήθηκε επίσης σήμα που αντιστοιχεί στην ύπαρξη της PDH στο εκχύλισμα των κυττάρων πριν και μετά την ανοσοκατακρήμνιση. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί

λαμβάνοντας υπόψη πως η ποσότητα του ενζύμου που αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα αποτελεί ένα πολύ μικρό μέρος της συνολικής ποσότητας του στο μιτοχόνδριο, οπότε η ύπαρξη μη ανοσοκατακρημνισθέντος ενζύμου στο εκχύλισμα των κυττάρων μετά την ανοσοκατακρήμνιση, είναι δικαιολογημένη. Με τη χρήση αντισώματος έναντι του υποδοχέα, ανιχνεύθηκε σήμα, γεγονός που αντιστοιχεί στην αποτελεσματική ανοσοκατακρήμνιση του GR κατά τη διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης. Η δυνατότητα αλληλεπίδρασης GR και PDH υποδηλώνει μία λειτουργική σχέση μεταξύ των δύο μορίων.

Η χρήση αντισώματος GR-H300 για την επίτευξη της ανοσοκατακρήμνισης του GR δεν επέτρεψε την ανίχνευση της PDH ως προϊόν ανοσοκατακρήμνισης ακόμα και με χρήση διπλάσιας ποσότητας κυτταρικού εκχυλίσματος κυττάρων HepG2.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών ελέγχει πληθώρα βιολογικών διεργασιών όπως ενεργειακός μεταβολισμός, κυτταρικός πολλαπλασιασμός και ανάπτυξη, διαφοροποίηση, ανοσολογικές αποκρίσεις και απόπτωση. Η εκδήλωση της δράσης του υποδοχέα επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της δράσης του ως μεταγραφικού παράγοντα. Ο μηχανισμός δράσης του υποδοχέα ως μεταγραφικός ρυθμιστής έχει μελετηθεί εκτεταμένα. Σύμφωνα με αυτόν, σε μη δεσμευμένη κατάσταση, ανενεργή, οι υποδοχείς είναι συστατικά ενός μακρομοριακού συμπλέγματος που αποτελείται από πρωτεΐνες θερμικού σοκ και συνοδές πρωτεΐνες, ενώ μετά τη σύνδεση του προσδέτη (LBD), η διαμόρφωση και η δυναμική τους συμπεριφορά αλλάζει. Ακολούθως απελευθερώνονται από το σύμπλεγμα ως μια ενεργή μορφή, διμερίζονται και αλληλεπιδρούν στον πυρήνα με τις αντίστοιχες αλληλουχίες DNA, δηλαδή τα στοιχεία απόκρισης στην ορμόνη (GREs).

Τα μιτοχόνδρια παρέχουν το 90% των ενεργειακών απαιτήσεων του κυττάρου σε ATP μέσω της σύζευξης της αναπνευστικής αλυσίδας και οξειδωτικής φωσφορύλιωσης. Τα μιτοχόνδρια ενέχονται σε πολλά βήματα του ενδιάμεσου μεταβολισμού, στην παραγωγή ουρίας, στη βιοσύνθεση της αίμης και στη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων. Επιπλέον, τα μιτοχόνδρια αποτελούν βασικά συστατικά της απόκρισης στο stress, διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στο οξειδωτικό στρες μέσω της παραγωγής δραστικών (ή ενεργών) μορφών οξυγόνου (ROS), στην ανοσολογική απόκριση, στην κυτταρική διαφοροποίηση και στη γήρανση.

Ο μεγάλος βαθμός κατανάλωσης οξυγόνου στην αερόβια παραγωγή ATP είναι αναπόφευκτος και έχει ως συνέπεια το σχηματισμό ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS), από τις οποίες ένας μεγάλος βαθμός μπορεί να απενεργοποιηθεί με την κατάλληλη ενζυμική επεξεργασία στο μιτοχόνδριο. Στην περίπτωση που δεν γίνει αυτό, οι ROS συσσωρεύονται με επιβλαβή αποτελέσματα στο DNA (μεταλλάξεις) και σε άλλα μακρομόρια, μειώνοντας έτσι τη διαθεσιμότητα σε ATP και αυξάνοντας το οξειδωτικό στρες, και τη διαπερατότητα των μιτοχονδριακών πόρων, ενεργοποιώντας έτσι αποπτωτικούς μηχανισμούς. Έτσι, η ρύθμιση των ενεργειακών απαιτήσεων είναι μια κύρια διαδικασία, που περιλαμβάνει μια πλειάδα από παράγοντες, που απαιτούν συντονισμό των μιτοχονδριακών διεργασιών με αυτές του πυρήνα. Τα μιτοχόνδρια αντιδρούν στα χαμηλά επίπεδα ADP με κινητοποίηση των μεταβολικά ανενεργών μιτοχονδρίων και με αλλοστερική ενεργοποίηση των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας - οξειδωτικής φωσφορύλιωσης (OXPHOS). Οι μεγαλύτερες ενεργειακές απαιτήσεις αντιστοιχούν και σε αυξημένη βιοσύνθεση OXPHOS, αυξημένη μεταγραφή των γονιδίων για OXPHOS στον πυρήνα και στα μιτοχόνδρια. (Psarra & Sekeris (2008).

Επιπλέον, οι στεροειδείς ορμόνες είναι μεταξύ των κύριων αποπτωτικών/αντιαποπτωτικών σημάτων. Αναλόγως με τη φύση του κυττάρου στόχου, η ίδια ορμόνη μπορεί να δράσει ως αποπτωτικός ή επιβιωτικός παράγοντας, λόγω των ιδιοτεροτήτων των ιστών στα μιτοχόνδρια. Επίσης,

πληθώρα ευρημάτων αποδεικνύουν ότι μερικά από τα ορμονικά αποπτωτικά/αντι-αποπτωτικά αποτελέσματα μεσολαβούνται από τους αντίστοιχους μιτοχονδριακούς υποδοχείς.

Ο συντονισμός της μεταγραφής OXPHOS γονιδίων στα δύο κυτταρικά διαμερίσματα επιτελείται μέσω της δράσης των στεροειδών και θυρεοειδών ορμονών, ενεργοποιώντας στον πυρήνα, όπου το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα αλληλεπιδρά με τις αντίστοιχες GREs, τη μεταγραφή πυρηνικών γονιδίων που κωδικοποιούν πυρηνικά κωδικοποιούμενες υπομονάδες OXPHOS, αλλά και μιτοχονδριακών μεταγραφικών παραγόντων που μετά την είσοδό τους στα μιτοχόνδρια ελέγχουν την έκφραση των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων OXPHOS, επιτυγχάνοντας έτσι τον απαραίτητο συντονισμό της μεταγραφής γονιδίων στα δύο κυτταρικά διαμερίσματα.

Μέχρι πρόσφατα, η έρευνα σχετικά με τον τρόπο με τον οποίο οι πυρηνικοί υποδοχείς και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες ασκούν τις φυσιολογικές τους λειτουργίες ήταν επικεντρωμένη κυρίως στη δράση τους μέσα στο πυρηνικό περιβάλλον και την αλληλεπίδρασή τους με πυρηνικά γονίδια. Η παρουσία των υποδοχέων στεροειδών ορμονών στα μιτοχόνδρια ποικίλων κυττάρων και ιστών (Psarra et al 2006) , καθώς και ο εντοπισμός στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα αλληλουχιών, οι οποίες εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα με τη συναινετική αλληλουχία GRE (Sekeris, 1990) et al. οδήγησαν στη διατύπωση της θεωρίας της απευθείας δράσης των υποδοχέων στεροειδών ορμονών στα μιτοχόνδρια και ειδικότερα της απευθείας εμπλοκής τους στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής.

Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα που δείχνουν απευθείας σύνδεση του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με τη ρυθμιστική D-loop περιοχή του μιτοχονδριακού DNA και την απευθείας ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής μεταγραφής (Psarra 2011) αποδεικνύουν την ορθότητα αυτής της υπόθεσης. Το ερώτημα που παραμένει είναι ο ακριβής χαρακτηρισμός του μηχανισμού δράσης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών μέσα στο μιτοχονδριακό περιβάλλον, ο οποίος πιθανόν να επιτελείται μέσω της αλληλεπίδρασής του με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες και ρυθμιστικά μόρια.

Στόχος αυτής της εργασίας ήταν η διερεύνηση της πιθανής αλληλεπίδρασης και λειτουργικής σύνδεσης συγκεκριμένων πρωτεϊνών με τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, οι οποίες έχουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφικής μηχανής και ελέγχου του μιτοχονδριακού μεταβολισμού. Η διερεύνηση αυτή έγινε με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης του GR και ανοσοαποτύπωσης κατά Western των ανοσοκατακρημνισθέντων πρωτεϊνών με χρήση ειδικών αντισωμάτων, τόσο σε ολικό εκχύλισμα κυττάρων ηπατοκαρκινώματος HepG2, όσο και σε μιτοχονδριακό εκχύλισμα κυττάρων ηπατοκαρκινώματος HepG2, που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με μιτοχονδριακή στόχευση.

Δεδομένου ότι ο μιτοχονδριακός υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών δρά ως μεταγραφικός παράγοντας και ρυθμιστής της μιτοχονδριακής μεταγραφής, αρχικά έγινε έλεγχος της πιθανότητας αλληλεπίδρασης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με τους μιτοχονδριακούς μεταγραφικούς παράγοντες TFB1M, TFB2M, mTFA και mTERF. Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες αποτελούν βασικά στοιχεία της μιτοχονδριακής μεταγραφικής μηχανής και η αλληλεπίδραση τους με το μιτοχονδριακό υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών μπορεί να καθιστά έναν επιπλέον μηχανισμό ρύθμισης της μιτοχονδριακής μεταγραφής. Για τον εντοπισμό των μιτοχονδριακών αυτών παραγόντων χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμα αντισώματα των οποίων η αποτελεσματικότητα αποδείχθηκε περιορισμένη γεγονός που δεν επέτρεψε την ανίχνευση τους ως συστατικά του πρωτεϊνικού συμπλόκου υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και συν – ανοσοκατακρημνισθέντων πρωτεϊνών, τόσο σε ολικό εκχύλισμα κυττάρων όσο και σε μιτοχονδριακό εκχύλισμα κυττάρων που υπερεκφράζουν το μιτοχονδριακό GR. Δεδομένου όμως ότι τα περισσότερα από τα αντισώματα, εκτός αυτού έναντι του TFB1M, που χρησιμοποιήθηκαν δεν κατάφεραν να ανιχνεύσουν τους αντίστοιχους μεταγραφικούς παράγοντες στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοκατακρήμνιση, το οποίο και περιείχε τους μεταγραφικούς παράγοντες σε πολύ μεγαλύτερη ποσότητα από αυτή που αναμένεται να ανιχνευθεί ως προϊόν ανοσοκατακρήμνισης, δεν αποκλείεται η πιθανότητα αλληλεπίδρασης του μιτοχονδριακού GR με αυτούς τους μεταγραφικούς παράγοντες, παρά το γεγονός ότι στις συνθήκες του πειράματος δεν μπόρεσε αυτή να ανιχνευτεί.

Εκτός από τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του υποδοχέα με τους μιτοχονδριακούς μεταγραφικούς παράγοντες, έγινε αντίστοιχη μελέτη διερεύνησης της πιθανής αλληλεπίδρασης του μιτοχονδριακού GR με την αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού (PDH). Το ένζυμο αυτό, υπάρχει σε σημαντικές ποσότητες στα μιτοχόνδρια, αφού είναι το συνδετικό βήμα μεταξύ της γλυκόλυσης και του κύκλου του κιτρικού οξέος. Ακολουθώντας την είσοδο του πυροσταφυλικού οξέος στα μιτοχόνδρια, από έναν άγνωστο ακόμα μεταφορέα, η PDH καταλύει τη μετατροπή του σε ακέτυλο-CoA, σε μια μη αναστρέψιμη αντίδραση. Τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης, με χρήση μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του GR, έδειξαν ιδιαίτερα αποτελεσματική ανοσοκατακρήμνιση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών τόσο σε ολικό εκχύλισμα κυττάρων, όσο και σε εκχύλισμα απομονωμένων μιτοχονδρίων. Η χρήση αντισώματος έναντι της PDH, σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western, για την εντόπιση συν-ανοσοκατακρημνισθέντων πρωτεϊνών, ανέδειξε την PDH ως μία πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τον GR στο μιτοχονδριακό περιβάλλον. Η χρήση του πολυκλωνικού αντισώματος έναντι του GR αποδείχθηκε λιγότερο αποτελεσματική στην ανοσοκατακρήμνιση του GR, σε σχέση με τη χρήση μονοκλωνικού αντισώματος. Η μικρότερη ποσότητα του ανοσοκατακρημνισθέντος GR με τη χρήση του πολυκλωνικού αντισώματος αντιστοιχούσε σε μικρότερη ποσότητα συν-ανοσοκατακρημνισμένης PDH, πιθανόν κάτω από τα όρια ανίχνευσης του αντισώματος, που τελικά οδηγούσε στη μη δυνατότητα ανίχνευσης της PDH ως πρωτεΐνης που αλληλεπιδρά με το GR. Η αδυναμία ανίχνευσης της αλληλεπίδρασης του GR με την PDH, κατά τη χρήση πολυκλωνικού αντισώματος έναντι του GR στη διαδικασία ανοσοκατακρήμνισης,

πιθανόν επίσης να οφείλεται στη δέσμευση από το πολυκλωνικό αντίσωμα θέσεων στο μόριο του GR κρίσιμων για την αλληλεπίδρασή του με την PDH, εμποδίζοντας κατά συνέπεια τη σύνδεση του GR με την PDH.

Η αλληλεπίδραση του GR με την PDH πιθανόν να αποτελεί ένα ρυθμιστικό μηχανισμό ελέγχου της δράσης του ενζύμου, του οποίου η διατήρηση σε ενεργή μορφή κατέχει εξέχουσα θέση στον καρκίνο. Το κλειδί για την κατανόηση της σημασίας της αλληλεπίδρασης PDH με τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, εντοπίζεται στο φαινόμενο Warburg. Σε πολλούς τύπους καρκινικών κυττάρων το ένζυμο αυτό είναι ανενεργό, οδηγώντας στην εξοικονόμηση των απαραίτητων ενεργειακών αναγκών του κυττάρου μέσω της γλυκολυτικής πορείας, με παράλληλη εξοικονόμηση πρόδρομων βιοσυνθετικών μορίων, απαραίτητων για τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Επομένως, η αυξημένη είσοδος του πυροσταφυλικού οξέος μέσα στα μιτοχόνδρια λόγω της ενεργοποίησης της PDH μέσω πιθανόν και της αλληλεπίδρασης με συγκεκριμένα μόρια, όπως ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών, και παράλληλα η ενεργοποίηση της αναπνευστικής αλυσίδας – οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, μέσω της δράσης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στην ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής μεταγραφής, προάγει τον αερόβιο μεταβολισμό της γλυκόζης, αναστρέφοντας το φαινόμενο Warburg και τις αλλαγές στον ενεργειακό μεταβολισμό που παρατηρούνται στα καρκινικά κύτταρα.

Οι πιο πάνω ενδείξεις δημιουργούν προοπτικές ως προς τη χρήση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών ως μόριο στόχο για την αντιμετώπιση διαταραχών στον καρκίνο. Ο πλήρης χαρακτηρισμός των μορίων που αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα στο μιτοχονδριακό περιβάλλον συμβάλλει στην κατανόηση των μηχανισμών δράσης του με τελικό αποτέλεσμα την απόκτηση γνώσης η οποία μπορεί να αξιοποιηθεί στη μελλοντική ανάπτυξη θεραπευτικών προσεγγίσεων στο καρκίνο χρησιμοποιώντας ως μόριο στόχο το μιτοχονδριακό υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alam, T. I., Kanki, T., Muta, T., Ukaji, K., Abe, Y., Nakayama, H., Takio, K., Hamasaki, N., and Kang, D. (2003). Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. *Nucleic Acids Res.* 31, 1640–1645
- Alberts B., Hopkin J., Lewis R., Roberts W.: Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας (απόδοση στα ελληνικά), 2<sup>η</sup> Έκδοση ed. Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2001
- Anderson, Bankier, Barell, de Bruijin, Coulson, Drouin et al.: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290 (1981) 457-65
- Antoshechkin, Bogenhagen, and Mastrangelo (1997). The HMG-box mitochondrial transcription
- factor xl-mtTFA binds DNA as a tetramer to activate bidirectional transcription. *EMBO J.* 16, 3198–3206
- Bayley and Devilee (2012). The Warburg effect in 2012. [www.co-oncology.com](http://www.co-oncology.com)
- Bradford, MM. (1976) A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254
- Beato, M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56, 335-344
- Brett A. Kaufman, Nela Durisic, Jeffrey M. Mativetsky, Santiago Costantino, Mark A. Hancock, Peter Grutter and Eric A. Shoubridge (2007). The Mitochondrial Transcription Factor TFAM Coordinates the Assembly of Multiple DNA Molecules into Nucleoid-like Structures. *Molecular Biology of the Cell* Vol. 18, 3225–3236, September 2007
- Cadepond, F., Gasc, J.M., Delahaye, F., Jimbard, N., Schweizer-Groyer, G., Segard-Maurel, I., Evans, R.M., Baulieu, E.E. (1992). Hormonal regulation of the nuclear localization signals of the human glucocorticosteroid receptor. *Exp. Cell Res.* 201, 99-108.
- Cao W, Yacoub S, Shiverick KT, Namiki K, Sakai Y, Porvasnik S, Urbanek C, Rosser CJ (2008). Dichloroacetate (DCA) sensitizes both wild-type and over expressing Bcl-2 prostate cancer cells in vitro to radiation. *Prostate* 68: 1223–1231
- Carlstedt-Duke, J., Okret, S., Wrange, O., Gustafsson, J.A. (1982). Immunochemical analysis of glucocorticoid receptor: identification of a third domain separate from the steroid-binding and DNA-binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4260-4264

- Carlstedt-Duke, J., Stormstedt, P.E., Wrangé, O., Bergman, T., Gustafsson, J.A., Jornvall, H. (1987). Domain structure of the glucocorticoid receptor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4437-4440
- C.B. Park, J. Asin-Cayuela, Y. Camara, Y. Shi, M. Pellegrini, M. Gaspari, R. Wibom, K. Hultenby, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, M. Falkenberg, C.M. Gustafsson, N.-G. Larsson, MTERF3 is a negative regulator of mammalian mtDNA transcription, *Cell* 130 (2007) 273–285.
- Chihiro Takamatsu, Shuyo Umeda, Takashi Ohsato, Tetsuji Ohno, Yoshito Abe, Atsushi Fukuoh, Hideo Shinagawa, Naotaka Hamasaki, Dongchon Kang (2002). Regulation of mitochondrial D-loops by transcription factor A and single-stranded DNA-binding protein. *EMBO reports* 3, 5, 451–456
- Chi V. Dang, Jung-whan Kim, Ping Gao & Jason Yustein, (2008). The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nature Reviews Cancer* 8, 51-56
- Danielsen, M., Northrop, J.P., Jonklaas, J., Ringold, G.M. (1987). Domains of the glucocorticoid receptor involved in specific and nonspecific deoxyribonucleic acid binding, hormone activation, and transcriptional enhancement. *Mol. Endocrinol.* 1, 816-822.
- Dongchon Kang, Sang Ho Kim, Naotaka Hamasaki (2007). Mitochondrial transcription factor A (TFAM): Roles in maintenance of mtDNA and cellular functions. *Mitochondrion* 7 (2007) 39–44
- Du, J., Wang, Y., Hunter, R., Wei, Y., Blumenthal, R., Falke, C., Khairova, R., Zhou, R., Yuan, P., Machado-Vieira, R., McEwen B.S., Manji, H.K. (2009). Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.A* 106, 3543-3548
- Emma E. Ramsay & Philip J. Hogg & Pierre J. Dilda (2011). Mitochondrial Metabolism Inhibitors for Cancer Therapy. *Pharm Res* (2011) 28:2731–2744
- Encio, I.J., Detera-Wadleigh, S.D. (1991). The genomic structure of human glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 266, 7182-7188
- Evans, R.M. (2005). The nuclear receptor superfamily: a rosetta stone for physiology, *Mol. Endocrinol.* 19, 1429–1438
- Falkenberg M, Gaspari M, Rantanen A, Trifunovic A, Larsson NG, Gustafsson CM (2002). Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat Genet.* 2002 Jul;31(3):289-94
- Fisher and Clayton (1985). A transcription factor required for promoter recognition by human mitochondrial RNA polymerase. Accurate initiation at the heavy- and light-strand promoters dissected and reconstituted in vitro. *J. Biol. Chem.* 260, 11330–11338



- Fisher and Clayton (1988). Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 8, 3496–3509
- Gatenby RA, Gillies RJ (2004) Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4: 891– 899
- Gavrilova-Jordan, L.P., Price T.M. (2007). Actions of steroids in mitochondria. *Semin. Reprod. Med.* 25, 154–164
- Gleyzer N, Vercauteren K, Scarpulla RC (2005). Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol Cell Biol.* 2005 Feb;25(4):1354-66
- Godowski, P.J., Rusconi, S., Miesfeld, R., Yamamoto, K.R. (1987). Glucocorticoid receptor mutants that are constitutive activators of transcriptional enhancement. *Nature* 325, 365-368
- Gronemeyer and Bourguet (2009). Allosteric Effects Govern Nuclear Receptor Action: DNA Appears as a Player. *Sci. Signal.* 2, pe34
- Guiochon-Mantel, A., Delabre, K., Lescop, P., Migrom, E. (1994). Nuclear localization signals also mediate the outward movement of proteins from the nucleus. *Proc Natl.Acad.Sci.USA* 91, 7179-7183
- Hu, X., Lazar, M.A. (1999). The CoRNR motif controls the rescrutment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature* 402, 93-96
- Hyvärinen, J.L. Pohjoismäki, A. Reyes, S.Wanrooij, T. Yasukawa, P.J. Karhunen, J.N. Spelbrink, I.J. Holt, H.T. Jacobs (2007). The mitochondrial transcription termination factor mTERF modulates replication pausing in human mitochondrial DNA, *Nucleic Acids Res.* 35. 6458–6474
- Ingle DJ (October 1950). "The biologic properties of cortisone: a review". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 10 (10): 1312–54
- Jan-Willem Taanman (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta* 1410 (1999); 103-123
- J. Asin-Cayuela, Y. Shi, C.M. Gustafsson, Initial characterization of MTERF4, a paralogue of MTERF1 (mTERF), EUROMIT 7, Stockholm, Sweden, June 11–14 2008, abstract n° 14, pg 20
- Jing Du, Bruce McEwen and Hussein K Manji (2009). Glucocorticoid receptors modulate mitochondrial function. A novel mechanism for neuroprotection. *Commun Integr Biol.* 2009 Jul-Aug; 2(4): 350–352.
- K. Ito, S. Yamamura, S. Essilfie-Quaye, B. Cosio, M. Ito, P.J. Barnes, I.M. Adcock, Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-κB suppression, *J Exp Med* 203(1) (2006) 7-13

- Klaus Scheller, Peter Seibel, and Constantine E. Sekeris (2003). Glucocorticoid and Thyroid Hormone Receptors in Mitochondria of Animal Cells. *International Review of Cytology*, Vol. 222 0074-7696/03
- Laemmli, UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259):680-685. (Η κλασσική δημοσίευση του Laemmli περί ηλεκτροφόρησης – Το άρθρο που έχει τις περισσότερες αναφορές στην ιστορία των επιστημονικών δημοσιεύσεων).
- Lu, N.Z, Cidlowski, J.A. (2005) Translational regulatory mechanisms generated N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Mol. Cell.* 18, 331-342
- Luca, C.T. Moraes, Functional analysis of mouse mTERF.D3, a novel mitochondrial transcription termination-like factor, *Mitochondrion* 6 (2006) 277 abstract.
- Marcel Schaaf J.M., Cidlowski, J.A. (2003). Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *J. of Steroid Bioch. & Mol. Biol.* 83, 37-48
- Marina Roberti, Paola Loguercio Polosa, Francesco Bruni, Caterina Manzari, Stefania Deceglie, Maria Nicola Gadaleta, Palmiro Cantatore (2009). The MTERF family proteins: Mitochondrial transcription regulators and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta* 1787 (2009) 303–311
- M. Beato, A. Sanchez-Pacheco, Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex, *Endocr Rev* 17(6) (1996) 587-609
- McEvwan, I.J., Wright, A.P.H., Dahlman-Wright, K., Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J.A. (1993). Direct interaction of the  $\tau_1$  transactivation domain of the human glucocorticoid receptor with the basal transcriptional machinery. *Mol. Cell. Biol.* 13, 399-407
- Michael Koukourakis, Alexandra Giatromanolaki, Efthimios Sivridis, Kevin C Gatter,<sup>†</sup> Adrian L Harris (2005). Pyruvate Dehydrogenase and Pyruvate Dehydrogenase Kinase Expression in Non Small Cell Lung Cancer and Tumor-Associated Stroma. *Neoplasia*. 2005 January; 7(1): 1–6
- Michelakis, L Webster and JR Mackey (2008). Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. *British Journal of Cancer* (2008) 99, 989 – 994
- M.J.Goldenthal, J. Marín-García, Mitochondrial signaling pathways: a receiver/integrator organelle, *Mol. Cell. Biochem.* 262 (2004) 1–16
- Moutsatsou, P., Psarra, A.M, Tsiapara, A., Paraskevakou, H., Davaris, P., Sekeris, C.E., (2001). Localization of the glucocorticoid receptor in rat brain mitochondria. *Biochim. Biophys.* 386, 69-78

- Nancy Cidlowski, John Cidlowski. (1981). Regulation of Glucocorticoid Receptors by Glucocorticoids in Cultured HeLa S<sub>3</sub> Cells
- Necela, Cidlowski. (2004). Mechanisms of Glucocorticoid Receptor Action in Noninflammatory and Inflammatory Cells. *Proc Am Thorac Soc* Vol 1. pp 239–246
- Newton Robert (2000). Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax* 2000;55:603-613
- Oakley, R.H., Cidlowski, J.A. (2011). Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* 286, 3177-3184
- Papamichail, M., Tsokos, G., Tsawdaroglou N., Sekeris, C.E. (1980). Immunocytochemical demonstration of glucocorticoid receptors in different cell types and their translocation from the cytoplasm to the cell nucleus in the presence of dexamethasone. *Exp. Cell Res.* 125, PubMed PMID: 6986277
- Patricio Fernández-Silva, José A. Enriquez and Julio Montoya. (2003). Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA). *Experimental Physiology* (2003) 88.1, 41–56
- Psarra, A.M.G., Bochaton-Piallat, M.L., Gabbiani G., Sekeris, C.E., Tsacopoulos M. (2003). Mitochondrial localization of glucocorticoid receptor in glial (Müller) cells in the salamander retina. *Glia* 41, 38-49
- Psarra, A.M.G., Hermann, S., Panayotou, G., Spyrou G. (2009). Interaction of mitochondrial thioredoxin with glucocorticoid receptor and NF-kappaB modulates glucocorticoid receptor and NF-kappaB signalling in HEK-293 cells. *Biochem. J.* 422, 521-531
- Psarra, A.M.G., Sekeris, C.E. (2007). Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: Regulatory molecules in a new environment. *Biochim. Biophys. Acta* 5, 431-436
- Psarra AM, Solakidi S, Sekeris CE. (2006). The mitochondrion as a primary site of action of steroid and thyroid hormones: presence and action of steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells. *Mol Cell Endocrinol*;246(1-2):21-33. Review. PubMed PMID: 16388892.
- Psarra, A.M.G., Sekeris, C.E. (2008). Steroid and thyroid Hormone Receptors in Mitochondria. *IUMLB Life* 60, 210-223
- Psarra, A.M.G., Sekeris, C.E. (2011). Glucocorticoids induce mitochondrial gene transcription in HepG2 cells role of the mitochondrial glucocorticoid receptor. *Biochim. Biophys.* 10, 1814-1821

- Psarra, A.M.G., Solakidi, S., Sekeris, C.E. (2006). The mitochondrion as a primary site of action of regulatory agents involved in neuroimmunomodulation, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1088, 12–22
- Psarra, A.M.G., Solakidi, S., Sekeris, C.E. (2006). The mitochondrion as a primary site of action of steroid and thyroid hormones: presence and action of steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells. *Mol. Cell Endocrinol* 246, 21-33
- Psarra, A.M.G., Solakidi, S., Trougakos, I.P., Margaritis, L.H., Spyrou, G., Sekeris, C.E. (2005). Glucocorticoid receptor isoforms in human hepatocarcinoma HepG2 and SaOS-2 osteosarcoma cells: presence of glucocorticoid receptor alpha in mitochondria and of glucocorticoid receptor beta in nucleoli. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 2544-2558
- R.C. Scarpulla, Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function, *Physiol. Rev.* 88 (2008) 611–638
- Rusconi, S., Yamamoto, K.R. (1987). Functional dissection of the hormone and DNA binding activities of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 6, 1309-1315
- Scheller, K., Sekeris, C.E., Krohne, G., Hock, R., Hansen, I.A., Scheer, U. (2000). Localization of glucocorticoid hormone receptors in mitochondria of human cells. *Eur. J. Cell Biol.* 79, 299–307
- Schoneveld, O.J., Gaemers, I.C., Lamers, W.H. (2004) Mechanisms of glucocorticoid signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1680, 114-128
- Sekeris CE. (1990) The mitochondrial genome: a possible primary site of action of steroid hormones. *In Vivo* 4(5):317-20. PubMed PMID: 2133104
- Schule, R., Muller, M., Kaltschmidt, C., Renkawitz, R. (1988). Many transcription factors interact synergistically with steroid receptors. *Science* 242, 1418-1420
- Sionov, R.V., Cohen, O., Kfir, S., Zilberman, Y., Yefenof, E. (2006). Role of mitochondrial glucocorticoid receptor in glucocorticoid-induced apoptosis. *Epub* 203, 189-201
- Sionov, R.V., Kfir, S., Zafir, E., Cohen, O., Zilberman, Y., Yefenof, E. (2006). Glucocorticoid-induced apoptosis: a novel role for glucocorticoid receptor translocation to the mitochondria. *Cell Cycle* 10, 1017-1026
- Susana Peralta, Xiao Wang, Carlos T. Moraes (2011). Mitochondrial transcription: Lessons from mouse models
- Warburg O, Wind F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol* 1927; 8:519–530

- Wrange, O., Okret, S., Radojcic, M., Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J.A. (1984). Characterization of the purified glucocorticoid receptor from rat liver cytosol. *J. Bio. Chem.* 259, 4534-454
- Xu RH, Pelicano H, Zhou Y, Carew JS, Feng L, Bhalla KN, Keating MJ, Huang P (2005) Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res* 65: 613–621